

Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl I - Vegetative Anatomie

Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

**Inhibitorische Transmittereingänge auf funktionelle Neuronengruppen
im Nucleus abducens des Menschen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Adam Dombi

aus

(Tatabánya / Ungarn)

Jahr

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Jens med. Waschke
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Kirsten H. Eibl-Lindner
	Prof. Dr. Walter Nathrath
Mitbetreuung durch die	
promovierte Mitarbeiterin:	Prof. Dr. rer.nat. A. Horn-Bochtler
Dekan:	Prof. Dr. med.Dr.h.c.M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 EXTRAOKULÄRE AUGENMUSKELN	1
1.1.1 Anatomie der extraokulären Augenmuskeln	1
1.1.2 Funktionen der extraokulären Augenmuskeln	2
1.1.3 Histologischer Feinbau der extraokulären Augenmuskeln	5
1.1.4 Motorische Innervation der extraokulären Augenmuskeln	6
1.2 HIRNNERVENKERNE DER EXTRAOKULÄREN AUGENMUSKELN	10
1.3 NUCLEUS ABDUCENS	11
1.3.1 Lokalisation und Aufbau des Nucleus abducens	11
1.3.2 Die Neuronengruppen des Nucleus abducens und ihre Funktion	11
1.3.3 Transmittereingänge des Nucleus abducens	13
1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT MIT FRAGESTELLUNG	14
2 MATERIAL, METHODEN UND AUSWERTUNG	15
2.1 OBDUKTIONSFÄLLE	15
2.2 PRÄPARATION	16
2.3 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG	16
2.4 GRUNDSCHRITTE DER ANFÄRBUNG	17
2.4.1 Entparaffinierung und Rehydrierung	17
2.4.2 Antigen-Demaskierung	17
2.5 SPEZIELLE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANFÄRBUNG	18
2.5.1 Antikörper	18
2.5.2 Immunperoxidase-Methode der Einfachfärbung	19
2.6 ENTWÄSSERN UND EINDECKELN	20
2.7 IMMUNPEROXIDASE-METHODE ZUR DOPPELFÄRBUNG	21
2.8 NISL FÄRBUNG	22
2.9 AUSWERTUNG	22
2.9.1 Bildaufnahme und Digitalisierung	22
2.9.2 Identifizierung der Neurone	23
2.9.3 Quantitative Analyse der Glutamatdecarboxylase(GAD)-haltigen Endigungen	26
2.9.4 Qualitative Analyse der Glycinrezeptor Alpha 1 (GlycRα1)	26
3 ERGEBNISSE	27
3.1 TECHNISCHE PROBLEME	27
3.1.1 Färbeverhalten der menschlichen Fällen	27
3.1.2 Verdünnung der Antikörper	27
3.1.3 Randeffekt	27
3.1.4 Schrumpfung durch die histologische Aufarbeitung	29
3.2 HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DES NUCLEUS ABDUCENS	31
3.3 CHOLINACETYLTRANSFERASE (CHAT) UND CHONDROITIN SULFAT PROTEOGLYKAN (CSPG) DOPPELFÄRBUNG IM NUCLEUS ABDUCENS	34
3.3.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)	34
3.3.2 Internukleäre Neurone (III)	35
3.3.3 Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone (IV)	35
3.4 GLUTAMATDECARBOXYLASE(GAD)-FÄRBUNG IM NUCLEUS ABDUCENS	36
3.4.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)	39
3.4.2 Non-Twitch Motoneurone außerhalb des Kerns im medialen Randbereich	39
3.4.3 Internukleäre Neurone (III)	43
3.4.4 Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone (IV)	43

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellpopulationen (ChAT/GAD)	44
3.5 GLYCINREZEPTOR ALPHA 1 (GLYCR1)-FÄRBUNG IM NUCLEUS ABDUCENS	46
3.5.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)	47
3.5.2 Internukleäre Neurone (III)	47
3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellpopulationen (Glycra1)	52
4 DISKUSSION.....	53
4.1 IDENTIFIZIERUNG FUNKTIONELLER NEURONENGRUPPEN IM NUCLEUS ABDUCENS.....	53
4.1.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)	53
4.1.2 Internukleäre Neurone (III)	55
4.1.3 Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone (IV)	56
4.2 INHIBITORISCHE TRANSMITTEREINGÄNGE AUF ZELLSOMATA DER FUNKTIONELLEN NEURONENGRUPPEN IM NUCLEUS ABDUCENS DES MENSCHEN	57
4.2.1 γ -Aminobuttersäure(GABA) im Nucleus abducens	57
4.2.2 Glycin im Nucleus abducens	58
4.3 INHIBITION (γ -AMINO BUTTERSÄURE(GABA) VS. GLYCIN) FUNKTIONELLER NEURONENGRUPPEN IM NUCLEUS ABDUCENS DES MENSCHEN	61
4.4 SCHLUSSFOLGERUNG	63
4.5 ZUSAMMENFASSUNG	64
5 ANHANG ZU MATERIAL UND METHODEN	66
5.1 LÖSUNGEN	66
5.2 PROTOKOLLE	67
5.2.1 DAB-Reaktion.....	67
5.2.2 Immunhistochemie der Einfachfärbung, Beispiel anhand einer ChAT-Färbung	68
5.2.3 Immunhistochemie der Doppelfärbung, Beispiel anhand einer ChAT/GAD-Färbung	70
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	74
7 TABELLENVERZEICHNIS.....	75
8 DIAGRAMMVERZEICHNIS	75
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
10 LITERATUR.....	78
11 DANKSAGUNG	89
12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	90

1 Einleitung

1.1 Extraokuläre Augenmuskeln

1.1.1 Anatomie der extraokulären Augenmuskeln

Der Augapfel des Menschen sitzt in der mit Fettgewebe ausgepolsterten knöchernen Höhle (Orbita) des Viscerocraniums. Das Auge wird durch sechs quergestreifte extraokuläre Augenmuskeln bewegt, die nach ihrem Verlauf in vier gerade (Musculi recti) und zwei schräge (Musculi obliqui) Muskeln unterteilt werden können (s. Abb. 1). Die vier geraden Augenmuskeln entspringen an der Öffnung des Canalis opticus von einem gemeinsamen fibrösen Ring (Annulus von Zinn = Annulus tendineus communis) (Kanski, 2008 a), der den Canalis opticus und zusätzlich einen kleinen medialen Teil der Fissura orbitalis superior umrahmt. Die Musculi recti ziehen weiter zum Augapfel unter der Bildung eines Muskeltrichters, in dem die Nerven und Gefäße, eingebettet im Fettgewebe, zum Auge verlaufen. Die vier Musculi recti setzen jeweils vor dem Äquator des Augapfels an. Im Unterschied dazu verläuft der Musculus obliquus superior (SO) von seinem Ursprung am Annulus von Zinn entlang der medialen Wand der Orbita, und wird durch einen Knorpelring (Trochlea) an der medialen Orbita umgelenkt. Sein Ansatz am Bulbus liegt unterhalb des Musculus rectus superior (SR). Der Musculus obliquus inferior (IO) entspringt an der medialen Wand der Orbita, zieht nach dorsal und lateral und inseriert hinter dem Äquator des Augapfels unterhalb des Musculus rectus lateralis. Ein siebter quergestreifter Muskel, der Musculus levator palpebrae superioris (LPS), der während der Evolution erst ab den Säugetieren auftritt und als Lidheber wirkt, wird wegen seines gemeinsamen Ursprungs, Verlaufs und Innervation zur extraokulären Muskulatur gezählt. Der LPS entspringt direkt über dem SR und zieht oberhalb von ihm zu seinem Ansatz. Der Muskel hat keinen unmittelbaren Kontakt zum Bulbus oculi, sein Ansatz strahlt als breitgefächerte Sehnenplatte in das Oberlid ein. Jedoch kleine abgespaltete Fasern der Sehnenplatte ziehen zum SR, dadurch kann der Muskel indirekt die Augenbewegungen modifizieren (Spencer and Porter, 2006). Die Augenmuskeln liegen in einer fibroelastischen Hülse, auch als „extraoculomotor (EOM) Pulleys“ bezeichnet, die als Halteapparat fungiert und der Tenon-Kapsel zugeordnet wird (Demer, 2002; Demer et al., 2000; Oh et al., 2001). Diese Strukturen sind über kollagene, elastische oder glatte muskuläre Fasern oder Sehnenansätze in der Nähe des Äquators an der Orbitawand fixiert (Clark et al., 1997; Demer et al., 1995; Kono et al., 2002; Miller et al., 2003; Porter et al., 1996). Diese

Pulleys fungieren als zusätzliche Fixationsstellen und verhindern ein Abgleiten der Augenmuskeln bei extremen Augenstellungen (Spencer and Porter, 2006).

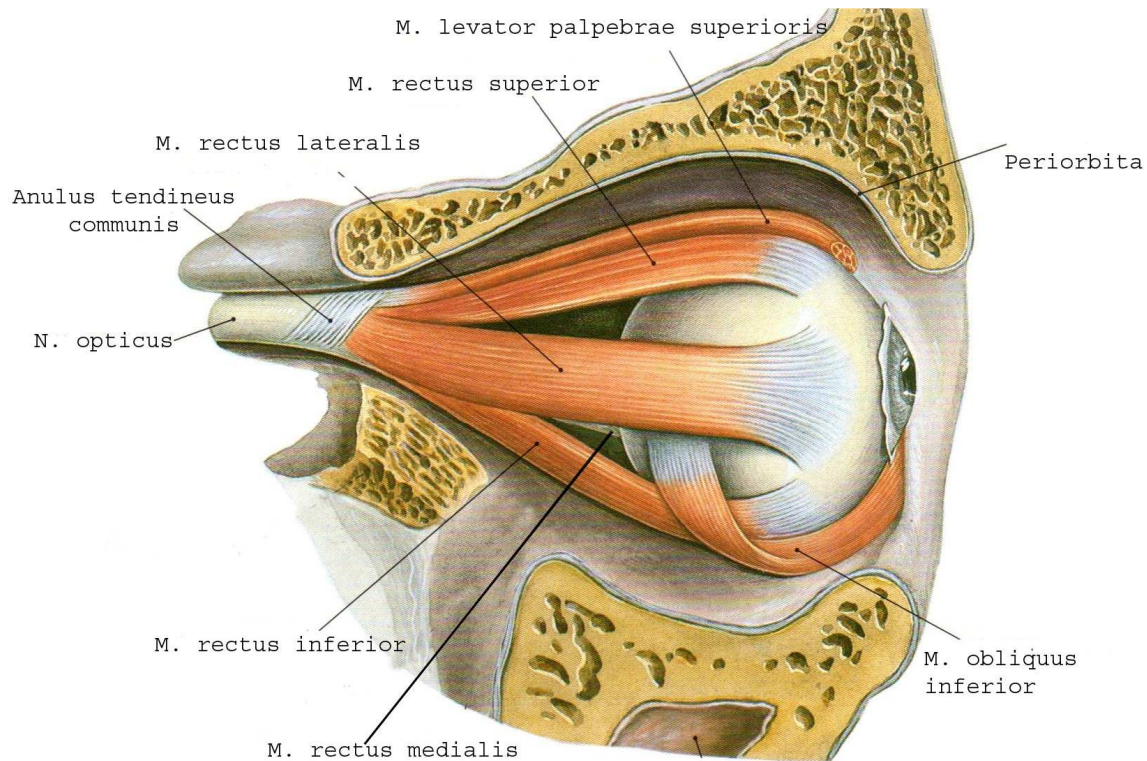


Abb. 1 - Übersicht der extraokulären Augenmuskeln des Menschen

(Sobotta - Anatomie des Menschen 22. Auflage; R. Putz und R. Pabst; (Abb. 1346; S. 746 / modifiziert /Ansicht von lateral)

1.1.2 Funktionen der extraokulären Augenmuskeln

Die effektive Zugwirkung (s. Tab.1) der Augenmuskeln wird durch die aktuelle Bulbusposition zur Orbitaachse zum Zeitpunkt der Kontraktion beeinflusst. Die medialen Wände der Orbita stehen parallel zu einander, die aber nach lateral divergieren, d.h. die lateralen und die medialen Orbitawände stehen in einem Winkel von 45° zueinander. Daraus ergibt sich eine Orbitaachse mit einem Winkel von $22,5^\circ$, aufgerundet 23° (s. Abb.2 - Bild a). Wenn der Kopf gerade steht und das Auge auf einen Fixierpunkt in der Ferne ausgerichtet ist (primäre Blickposition), dann bilden entsprechend die Sehachsen einen Winkel von 23° mit der Orbitaachse (s. Abb.2 - Bild b).

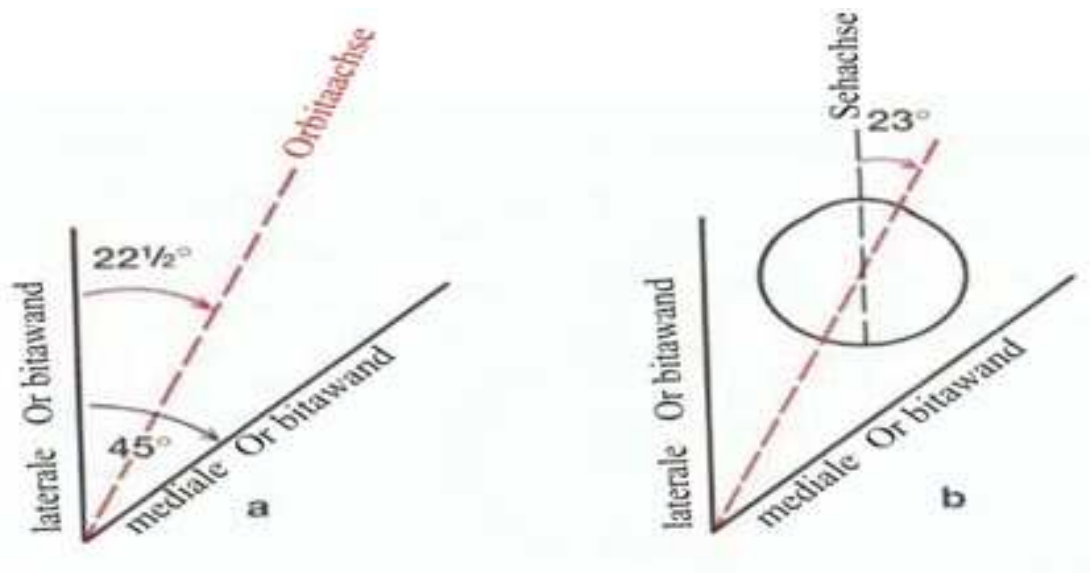


Abb. 2- Schematische Darstellung des Auges in der Orbita

(Klinische Ophthalmologie 6. Auflage; Kanski J. 2008a; Abb. 20.2 (S. 754) / modifiziert/)

Jeder Augenmuskel besitzt eine Hauptfunktion und eine Nebenfunktion. Die Hauptfunktion wird ausgeführt, wenn das Auge sich in Primärposition befindet, die Nebenfunktion hängt von der augenblicklichen Stellung des Auges zur Orbitaachse ab (Kanski, 2008a). Die definitiven Bewegungen und Positionen des Auges im Raum sind Folge der Summation der einzelnen Muskelaktivitäten, die durch die Kontraktion eines oder mehrerer Muskeln (Agonisten) und die simultane Relaxation der Antagonisten entsteht (Leigh and Zee, 2006). Dieses genaue Zusammenspiel der Augenmuskeln ermöglicht die Ausführung spezieller Augenbewegungsmuster, die im Hirnstamm über unterschiedliche prämotorische Bahnen entstehen und in gemeinsamer Endstrecke auf den Motoneurone der Augenmuskelkerne konvergieren. Beim Primaten können diese Augenbewegungstypen in fünf Klassen unterteilt werden: 1-vestibulo-okulärer Reflex (VOR); 2 - optokinetischer Reflex; 3 - Sakkaden (Blicksprünge); 4 - langsame Augenfolgebewegungen (smooth pursuit); 5 - Vergenz (einzige diskongjugierte Augenbewegung) (Büttner and Büttner-Ennever, 2006).

	Muskel Innervation	Hauptfunktion	Nebenfunktion	Ursprung	Ansatz
4 Musculi recti	rectus superior /SR/ kontralateraler N. III	Hebung	Adduktion Inzykloduktion	Zinn'scher Ring (oben) und Dura mater des Sehnervs	7,7 mm hinter dem oberen Limbus
	rectus medialis /MR/ ipsilateraler N. VI	Adduktion	keine	Zinn'scher Ring (medial) und Dura mater des Sehnervs	5,5 mm hinter dem nasalen Limbus
	rectus inferior /IR/ ipsilateraler N. III	Senkung	Adduktion Exzykloduktion	Zinn'scher Ring (unten)	6,5 mm hinter dem unteren Limbus
	rectus lateralis /LR/ ipsilateraler N. VI	Abduktion	keine	Zinn'scher Ring (lateral) und akzessorische Ursprung	6,9 mm hinter dem temporalen Limbus
2 Musculi obliqui	obliquus superior /SO/ kontralateraler N. IV	Inzykloduktion	Senkung Abduktion	superomedial des Foramen opticums und Umlenkung durch die Trochlea	dorsolateral am hinteren oberen temporalen Quadrant des Bulbus
	obliquus inferior /IO/ ipsilateraler N. III	Exzykloduktion	Hebung Abduktion	direkt hinter der Orbitakante, seitlich vom Tränensack	dorsolateral am hinteren unteren temporalen Quadranten des Bulbus
LPS	lev. palpebrae sup. LPS kontrovers diskutiert bilateral kontralateraler N. III	Lidhebung keine direkte Funktion am Bulbus	indirekt Modifizierung der Zugrichtung des SR	oberhalb des Foramen opticums über der Sehne des SR	breitgefächert im Oberlid (Septum orbitale und Tarsus) und einzelne Fasern im SR

Tab. 1 - Übersicht der extraokulären Augenmuskeln und deren detaillierte Funktion

1.1.3 Histologischer Feinbau der extraokulären Augenmuskeln

Die extraokulären Augenmuskeln lassen sich im Unterschied zum normalen Skelettmuskel beim Säuger, einschließlich der Mensch, in drei Schichten gliedern. Von außen nach innen werden folgende drei Schichten unterschieden: eine äußere, der knöchernen Orbita anliegende Schicht wird beim Mensch postuliert und wurde von Wasicky als „marginale Schicht / Layer“ beschrieben (Wasicky et al., 2000). Diese Schicht folgt die mittlere, aus schmalen Muskelfasern bestehende „orbitale Schicht / Layer“, die sich nicht über die gesamte Muskellänge erstreckt, sondern vor dem distalen muskulotendinösen Übergang abzweigt und in die Pulleys übergeht (s. Kap. 1.1.1) (Demer et al., 2000; Miller et al., 2003). Die dem Bulbus angrenzende Schicht, die „globale Schicht“ enthält dickere Muskelfasern, welche den Muskel komplett der Länge nach durchziehen (Oh et al., 2001; Spencer and Porter, 2006) (s. Abb. 3).



Abb. 3 - Schematische Darstellung der Kompartimente der extraokulären Augenmuskeln

Als Erklärung für diesen schichtweisen Aufbau der Muskeln postuliert man eine unterschiedliche Auswirkung auf die Bulbusbewegungen. Man nahm wohl an, dass die globale Schicht an der Rotation des Auges beteiligt ist und die orbitale Schicht bei der Positionierung der Pulleys eine wichtige Rolle spielen könnte, beschrieben als die „Aktive Pulley-Hypothese“ (Demer, 2002; Oh et al., 2001). Die Skelettmuskelfasern konnten – was ihren makro- und mikroskopischen Aufbau, ihren Stoffwechsel sowie ihre Kapillarisation, Kontraktionsschnelligkeit, Farbe, Enzymaktivität und ihre Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel und Temperaturänderungen betrifft – bis dato in vier verschiedene Muskelfasertypen eingeordnet werden: Typ I (slow-Twitch-

oxidative, müdigkeitsresistent); IIA (fast-Twitch-oxidative, müdigkeitsresistent); IIX (fast-Twitch, schnell ermüdend); IIB (fast-Twitch-glycolytic, intermediär). Bereits im Jahre 1874 veröffentlichte der französische Anatom Louis-Antoine Ranvier anhand von Tierversuchen die erste morphologische Unterscheidung (Ranvier, 1874), dass die Muskelfasern, die in ihrer Farbgebung dunkelrot erscheinen, sich auf eine langsamere, mehr anhaltende Weise zusammenziehen als die helleren Muskelfasern derselben Species. Diese Beobachtung ist die Grundlage für die klassische Nomenklatur von roten (tonischen)- und weißen (phasischen)-Muskelfasern (Tittel, 2003). Die Muskelfasertypen lassen sich weiter anhand ihrer biochemischen, histochemischen, immunzytochemischen, ultrastrukturellen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden. Im Jahre 1949 wurden von Krüger histologisch zwei Faserarten im Skelettmuskel beschrieben: 1- Fibrillenstruktur; 2- Felderstruktur (Krüger, 1949). Diese zwei Muskelfaserarten entsprechen den „einzeln- und multipel-innervierten“ Muskelfasern (Bondi, 1983; Lennerstrand, 1977). Bei Säugtieren konnten in den Augenmuskeln bisher insgesamt sechs Fasertypen identifiziert werden (Spencer and Porter, 2006).

1.1.4 Motorische Innervation der extraokulären Augenmuskeln

Die sechs Augenmuskeln werden von drei Paar Nerven, die aus den gleichnamigen Hirnstammkernen hervorgehen, versorgt: dem Nervus oculomotorius (III); dem Nervus trochlearis (IV) und dem Nervus abducens (VI) (s. Tab. 1 / Abb. 5) (Büttner-Ennever, 2006). Während die Skelettmuskulatur große motorische Einheiten aufweist, d.h. von einer Nervenfasern werden ca. 300-400 Muskelfasern innerviert, sind sie bei den Augenmuskeln klein mit nur etwa 10 Muskelfasern. Die kleinen motorischen Einheiten ermöglichen eine feine Augenbewegung, die für die präzise Ausrichtung und für das Zusammenspiel beider Augen unentbehrlich sind (Szentágothai, 1971; Kaufman, 2003 a; Burke et al., 1973; Burke et al., 1971).

1.1.4.1 Twitch Fasern und non-Twitch Fasern

Nach Innervationsmuster und Kontraktionseigenschaften lassen sich die Muskelfasertypen in zwei Hauptkategorien einteilen(s. Abb. 4):

Die „**einzelnnervierten**“ Muskelfasern(SIFs/ Twitch) mit Fibrillenstruktur, die man typischerweise in der Skelettmuskulatur findet (Brooke and Kaiser, 1970; Burke et al., 1971; Peter et al., 1972; Schiaffino et al., 1989; Schiaffino and Reggiani, 1994), werden von dicken Axonen (7-11 μ m) über jeweils eine einzelne breite „en plaque“ Endplatte im zentralen Drittel der Muskelfasern innerviert (Kaczmarek, 1974; Namba et al., 1968). Elektrische Reizung resultiert nach dem „Alles oder Nichts“-Gesetz mit einem fortgeleiteten Aktionspotential über die gesamte Muskellänge mit einer schnellen Kontraktion (Twitch). Die rasch ermüdenden SIFs dienen vor allem den schnellen phasischen Augenbewegungen, deswegen werden sie auch Fast- oder Twitch-Fasern genannt.

Die „**multinervierten**“ Muskelfasern (MIFs / non-Twitch) mit Felderstruktur werden von dünnen Axonen (kleiner als 7 μ m) durch multiple „en grappe“ Endplatten über die gesamte Länge der Muskelfasern innerviert. Stimulation der Nerven resultiert in lokalen nicht-fortgeleiteten Potentialen, was zu einer langsamen tonischen Kontraktion(non-Twitch) führt,sie werden als Slow- oder non-Twitch Fasern bezeichnet (Kaufmann, 2004;Spencer and Porter, 2006; Kaufman, 2003 b). Die MIFs sind typisch für alle Muskeln bei Amphibien und Vögel (Morgan and Proske, 1984), jedoch untypisch für Säugetiere (Porter et al., 1995; Spencer and Porter, 2006). Bei Menschen sind die MIFs außer in den Augenmuskeln nur noch im Larynx vorhanden (Brandt and Leeson, 1966; Dietert, 1965; Han et al., 1999). Die MIFs vom Felderstrukturtyp leisten eine langsame Kontraktion und tonische Haltearbeit. Beide Muskelfasertypen sind sowohl in der orbitalen Schicht als auch in der globalen Schicht vorhanden (Spencer and Porter, 2006).

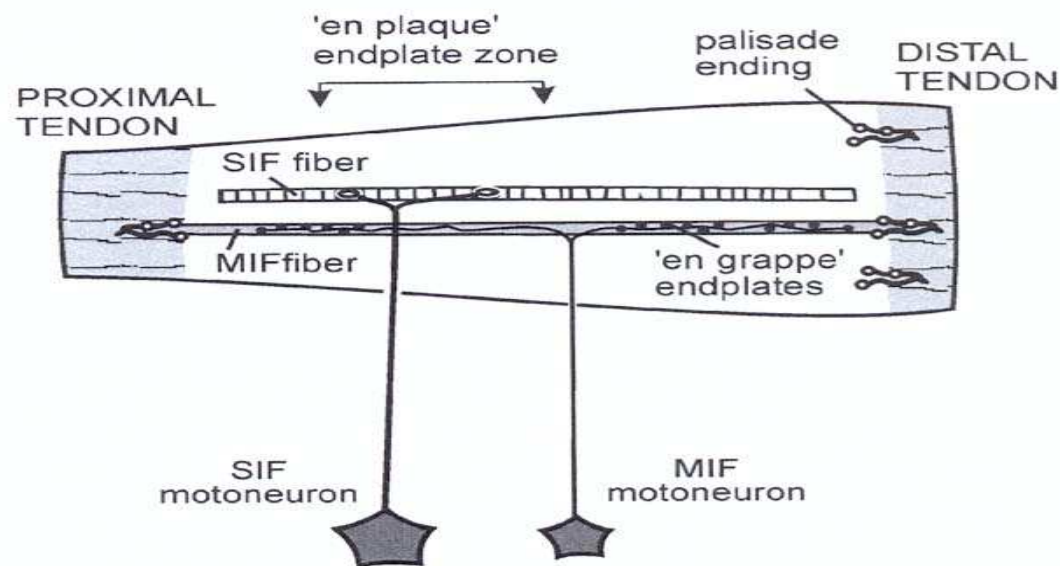


Abb. 4 - Schematische Darstellung der Muskelfasertypen im Augenmuskel

(Büttner- Ennever 2006 - Abb. 4/ modifiziert/)

1.1.4.2 Twitch und non-Twitch Motoneurone

Die die Twitch- bzw. non-Twitch- Fasern innervierenden Motoneurone konnten mithilfe retrograd transportierter Tracer nach Injektion in einzelne Augenmuskeln an Ratten und Rhesusaffen identifiziert und deren histochemische Eigenschaften detailliert untersucht werden (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005; Eberhorn et al., 2006). Dabei markierte die Injektion des Tracers in den Muskelbauch sowohl die Twitch als auch die non-Twitch Motoneurone, während die Injektion des distalen Abschnitts des Muskels nur die non-Twitch Motoneurone markierte (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2006). Man ging davon aus, dass durch die Injektion in den muskulotendinösen Übergang nur die non-Twitch Motoneurone der globalen Schicht markiert wurden, da die orbitale Schicht bereits vorher abzweigt (Demer et al., 2000; Oh et al., 2001). Die Bestimmung der weiteren histochemischen Eigenschaften dieser Neuronengruppen, die auch als Identifikationsmerkmale dienen können, erfolgte durch die konsekutiven immunhistochemischen Färbungen der Tracer-markierten oder mit cholinergen Markern gefärbten Motoneuronen auf zusätzliche Marker. Eine Immun-Färbung auf Cholinacetyltransferase (ChAT) färbt beide Motoneuronenpopulationen (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005), wobei nur die Twitch-Motoneurone zusätzlich perineuronale Netze (PNN), nachgewiesen mit Antikörper gegen Chondroitinsulfat Proteoglykane (CSPG), aufweisen (Härtig et al., 1994). Desweiteren enthalten nur die Twitch-Motoneurone nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF), nicht aber die non-Twitch Motoneurone (Eberhorn et al.,

2005). Im Unterschied zu den Twitch Motoneurone, die beim Rhesusaffen innerhalb der Augenmuskelkerne im Hirnstamm lokalisiert sind, liegen die non-Twitch Motoneurone außerhalb der Augenmuskelkerne (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005; Eberhorn et al., 2006). Mit kombinierten ChAT- und CSPG-Färbungen konnten auch beim Menschen die putativen Twitch und non-Twitch Motoneurone im Nucleus oculomotorius (Horn et al., 2008) und Nucleus abducens (Horn, 2011) identifiziert werden.

1.2 Hirnnervenkerne der extraokulären Augenmuskeln

Die äußeren Augenmuskeln werden von drei paarig angelegten Hirnnervenkernen über die gleichnamigen Hirnnerven versorgt. Von rostral nach caudal sind das der Nucleus oculomotorius (III), der im Tegmentum in der Höhe des Mittelhirns ventral vor dem Aquädukt und eingebettet in den Fasern des medialen longitudinalen Faszikels (MLF) lokalisiert ist, gefolgt von dem Nucleus trochlearis (IV), der ventral des Aquaeductus Sylvii auf Höhe des Colliculus inferior sitzt. Am caudalsten liegt der Nucleus abducens (VI) (s. Kap. 1.3 und Abb.5 A und E) (Büttner-Ennever, 2006; Szentágothai, 1971; Kanski, 2008 b).

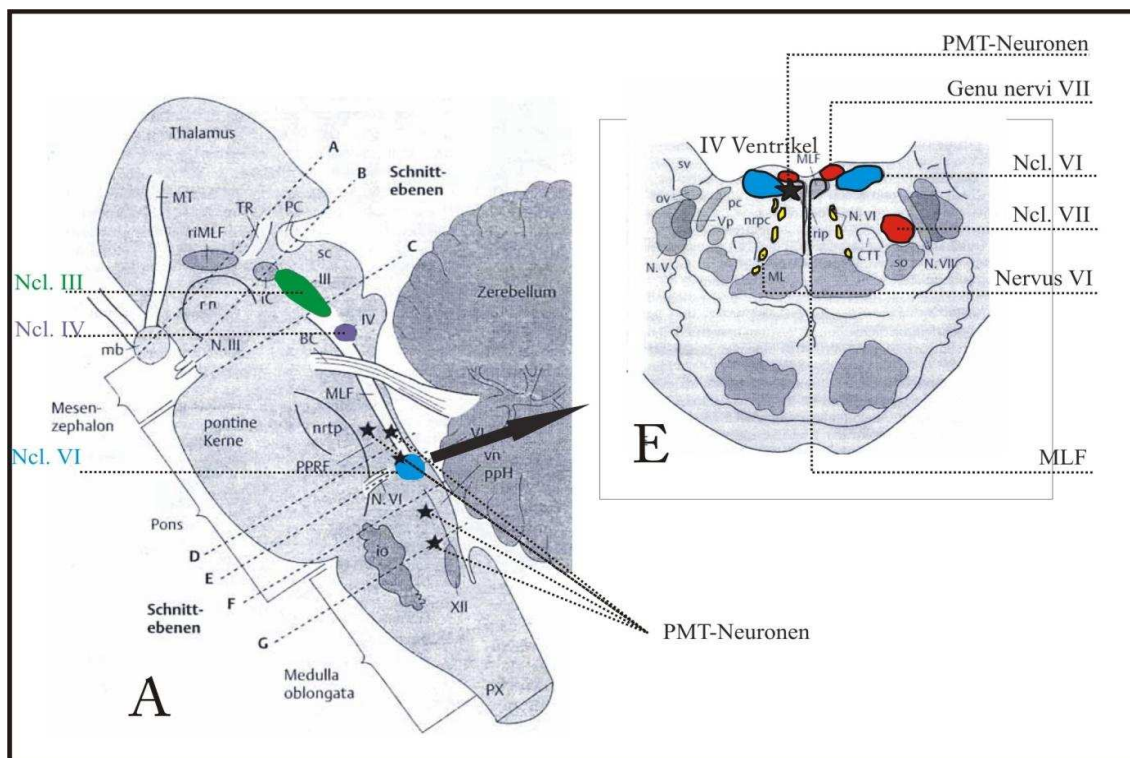


Abb. 5 – Darstellung der Lokalisation des Nucleus abducens im Hirnstamm

(Neuroanatomie der okulomotorischen Kerne, Hirnstammzentren und – bahnen. Horn A.K.E, Büttner-Ennever J.A 1997 In: Huber A, Kömpf D (eds): Neuro-Ophthalmologie, Thieme Verlag, pp. 34-47. Abb. 2.9 (S. 34; Bild A); 2.11 (S. 40; Bild E)/ modifiziert/)

Bild A: Schematisierter Sagittalschnitt durch den menschlichen Hirnstamm mit Darstellung der Hirnnervenkerne der extraokulären Augenmuskeln (Ncl. oculomotorius (III); Ncl. trochlearis (IV); Ncl. abducens (VI))

Bild E: Transversalschnitt durch den Hirnstamm auf Höhe des Ncl. abducens und schematische Darstellung der Lage des Ncl. abducens

1.3 Nucleus abducens

1.3.1 Lokalisation und Aufbau des Nucleus abducens

Das Hauptziel dieses Projektes ist die Untersuchung der Transmittereingänge auf verschiedene funktionelle Neuronengruppen im Nucleus abducens des Menschen. Der Nucleus abducens liegt am Boden des vierten Gehirnvventrikels im Übergangsbereich zwischen der Medulla oblongata und Pons und wird dorsal von dem inneren Knie des Nervus facialis und nach medial von dem MLF begrenzt (s. Abb. 5 - Bild A und E). Aufgrund dieser unmittelbaren Nähe der beiden Strukturen ist eine isolierte nukleäre Abducensparese unwahrscheinlich. Dabei weist eine nukleäre Abducensparese meist folgende Symptome auf: I- ipsilaterale Abduktionsschwäche; II- Blick zur Seite der Läsion in der horizontalen Ebene nicht möglich; III- häufiges Begleitsymptom ist eine ipsilaterale Schädigung des Nervus facialis (s. Kap. 1.3.2)(Kanski, 2008 b).

1.3.2 Die Neuronengruppen des Nucleus abducens und ihre Funktion

Der Ncl. abducens des Menschen erscheint in caudalen Ebenen etwas queroval, wird aber nach rostral zunehmend runder (s. Abb. 10 -Bild A / I, II, III). Im Kern lassen sich bisher vier funktionelle Neuronenpopulationen voneinander trennen, die sich anhand ihrer unterschiedlichen histochemischen Eigenschaften unterscheiden lassen (Büttner-Ennever, 2006; Eberhorn et al., 2005; Horng, 2011).

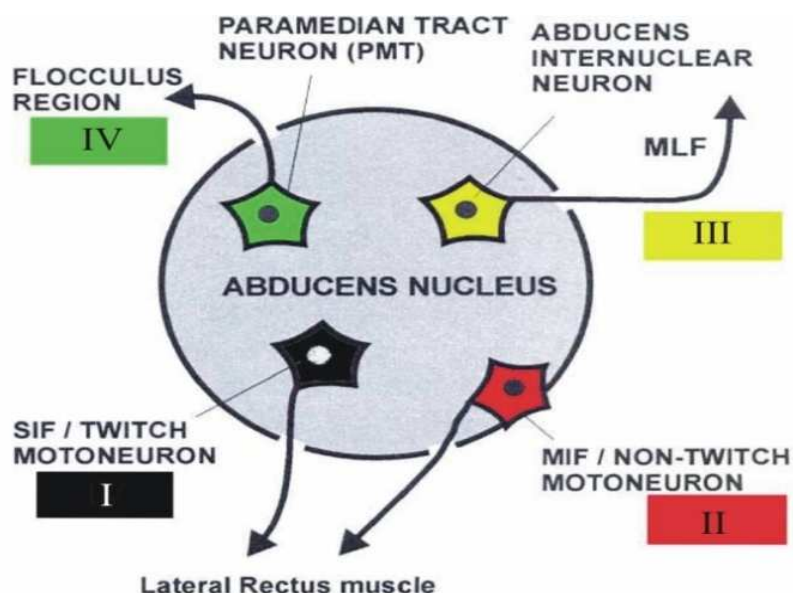


Abb. 6- Darstellung der vier Neuronentypen des Nucleus abducens

(Büttner- Ennever 2006- Abb. 6 /modifiziert/)

1.3.2.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)

Twitch und non-Twitch Motoneurone, die den ipsilateralen Musculus rectus lateralis innervieren. Wie bereits in Abschnitt 1.1.4.2 näher beschrieben wurde, unterscheiden sich beide Populationen in ihrer Histochemie (Eberhorn et al., 2005), an Hand derer sie beim Menschen lokalisiert wurden (Horng, 2011). Der Ausfall dieser Neurone führt zu einer Abduktionsschwäche des betroffenen Auges (Kanski, 2008 b).

1.3.2.2 Internukleäre Neurone (III)

Die efferenten Axone der internukleären Neurone des Nucleus abducens ziehen über den MLF zum kontralateralen Oculomotoriuskern (III) und terminieren an den Motoneurone des Musculus rectus medialis (MR)(Nakao and Sasaki, 1980; Büttner-Ennever and Akert, 1981). Diese Verbindung ist die neuroanatomische Grundlage für horizontale konjugierte Augenbewegungen (Büttner-Ennever, 2006). Wie Motoneurone sind die internukleären Neurone von perineuronalen Netze umgeben (Eberhorn et al., 2005). Anders als die Motoneurone benutzen die internukleären Neurone nicht Acetylcholin als Transmitter, sondern vermutlich Glutamat (Spencer and Baker, 1986; Carpenter et al., 1992; Nguyen and Spencer, 1999). An Hand dieser histochemischen Eigenschaften sind diese Neuronenpopulationen auch beim Menschen identifiziert worden (Horng, 2011).

1.3.2.3 Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone(IV)

Als PMT-Gruppen-Neuronen werden zusammenfassend die Neurone bezeichnet, die entlang der Mittellinie im Gehirnstamm lokalisiert sind, zum Flocculus des Kleinhirns projizieren und von allen vertikalen und horizontalen Prämotorarealen Eingänge erhalten(Büttner-Ennever and Büttner, 1988; Büttner-Ennever et al., 1989; Büttner and Büttner-Ennever, 2006; Langer et al., 1985; Nakamagoe et al., 2000). Ein Ausfall dieser Neuronengruppen führt zu einer Beeinträchtigung der Blickhaltung (Anagnostou et al., 2009; Büttner and Straube, 1995). Eine dieser PMT-Gruppen sitzt im Nucleus abducens als eine rostrale Kappe und weist eine hohe Cytochromoxidase-Aktivität auf (Buresch, 2005) (s. Abb. 5 - Bild A und E).

1.3.3 Transmittereingänge des Nucleus abducens

Die Motoneurone der Augenmuskeln erhalten erregende und hemmende Eingänge von prämotorischen Arealen, die unter anderem von vestibulären Arealen und Arealen der Formatio reticularis stammen (Horn und Adamczyk, 2012). Die excitatorischen Signale werden vornehmlich über Glutamat und Aspartat vermittelt, die inhibitorischen durch Glycin und γ -Aminobuttersäure(GABA). Hierbei wurde bei Katze und Affe gezeigt, dass der Ncl. abducens, der die horizontalen Augenbewegungen steuert, viel glycinerge Eingänge bekommt, die Areale für vertikale Augenbewegungen im Ncl. oculomotorius und trochlearis jedoch mehr GABAerge Eingänge erhalten. Diese Beobachtungen veranlassten zu der Hypothese, dass Glycin die horizontale und GABA die vertikale Augenbewegungen kontrollieren(de la Cruz et al., 1992; Spencer and Baker, 1992; Spencer et al., 1992; Spencer et al., 1989).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit mit Fragestellung

Das Hauptziel dieses Projektes ist die Untersuchung des Nucleus abducens auf seine inhibitorischen Transmittereingänge beim Menschen und inwieweit Unterschiede zum Affen bestehen.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

I. - Inwieweit erhält der Nucleus abducens beim Menschen GABAerge und/oder glycinerge Transmittereingänge?

II. - Inwieweit lassen sich die inhibitorischen GABAergen/glycinergen Transmittereingänge mit Twitch, non-Twitch Motoneurone und internukleären Neurone korrelieren. Wie unterscheidet sich die Dichte der inhibitorischen Transmittereingänge auf einzelne funktionelle Neuronengruppen?

Die Untersuchung erfolgte an humanen Hirnstammschnitten, in denen die Motoneurone mit einer Immunfärbung auf Cholinacetyltransferase identifiziert wurden und Twitch und non-Twitch Motoneurone zusätzlich durch eine Anfärbung auf perineuronale Netze voneinander unterschieden wurden. Die GABAergen Nervenendigungen wurden mit einem Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD), die glycinergen Eingänge mit einem Antikörper gegen Glycinrezeptor (GlycR) nachgewiesen.

2 Material, Methoden und Auswertung

2.1 Obduktionsfälle

Untersucht wurden menschliche Gehirne, welche uns mit freundlicher Genehmigung von der Gewebekbank des Institutes für Pathologie, Gerichtsmedizin und der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt wurde. Alle Untersuchungen unterlagen der Kontrolle der Ethikkommission und wurden gemäß den staatlichen Regulationen durchgeführt. Das Gewebe entstammte aus folgenden Fällen (s. Tab. 2).

	Fall 1	Fall 2	Fall 3
Herkunft	Neuropathologie	Anatomie	Gerichtsmedizin
Geschlecht	weiblich	männlich	männlich
Alter	57 Jahre	69 Jahre	51 Jahre
post mortem Zeit	weniger als 24h	24 h	24 h
Sonstiges	-	Metastasen	Schädel-Hirn-Trauma
Fixierung	Hirnstamm-Blöcke wurden in Fixativ(10% Paraformaldehyd) über 6 Tage gelagert, dann Einbettung in Paraffin	Hirnstamm-Blöcke wurden in Fixativ(4% Paraformaldehyd) über 6 Tage gelagert, dann Einbettung in Paraffin	Hirnstamm-Blöcke wurden in Fixativ(4% Paraformaldehyd) über 4 Tage gelagert, dann Einbettung in Paraffin
Funktion in der Doktorarbeit	Hauptfall für die Darstellung der Transmittereingänge des Ncl. abducens	Referenzfall für die Darstellung der Transmittereingänge des Ncl. abducens	Visualisierung für die Darstellung des Färbeverhalten des Ncl. abducens

Tab. 2 - Übersicht der Herkunft und Besonderheiten der Präparate

2.2 Präparation

Nach der Entfernung des Hirnstamms wurden die Präparate für 4-6 Tage in Paraformaldehyd (PFA) (Fall 1: 10% PFA; Fall 2: 4%PFA; Fall 3: 4% PFA; s. Tab. 2) gelagert, damit man eine Erhärtung, die für ein seitengleiches Durchtrennen notwendig ist, erzielen konnte. Vor der Einlegung in die PFA-Lösung wurden die makroskopisch sichtbaren Gefäße und Verunreinigungen entfernt. Nach ausreichender Fixierung wurde ein Gewebeblock, der caudal von der oberen Medulla oblongata bis auf Höhe der Pons nach rostral reichte, und damit den Ncl. abducens enthielt (s. Abb.5 Bild A), geschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass der Block eine Größe von nicht mehr als 2x2x2 cm hatte, womit eine gute Durchdringung mit Fixier- und Alkohollösungen für die Histologie gewährleistet war. An der linken Seite des Blockes wurde ein keilförmiges Stück als Markierung für die spätere Seitenbestimmung herausgeschnitten. Für die Paraffinschnitte (Fall 1 und 2) wurde eine gepufferte Paraformaldehydlösung (PFA 10%; 4% in 0,1M PBS, PH 7,4) verwendet, und die Präparate wurden ca. für 6 Tage eingelegt. Nach ausreichender Fixierung wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70%-90%-96%-100%) entwässert und in Paraffin eingebettet. Der Gewebeblock für die Gefrierschnitte von Fall 3 wurde nach der Fixierung in 4% PFA-Lösung in aufsteigender Sucrosereihe (10%-20%-30% in 0,1 M PBS pH 7,4), die als Gefrierschutzmittel fungiert, gelegt und bis zum Zeitpunkt des Absinkens aufbewahrt.

2.3 Histologische Aufarbeitung

Vom Gewebeblock der Fall 1 und 2 wurden mit einem Schlittenmikrotom (R. Jung AG Heidelberg) Paraffinschnitte mit einer Dicke von 10 µm geschnitten. Dabei wurden benachbarte Schnittserien für die immunhistochemischen Färbungen und orientierende Nisslfärbungen erstellt. Die Paraffinschnitte wurden nach der Streckung im Wasserbad (Temperatur <50°C) auf silanisierte oder superfrost® Objektträger aufgezogen. Zur Anfertigung der Gefrierschnitte vom Fall 3 wurde eine 5 mm dicke Gelatineplatte auf den Objekttisch eines Kryostaten (Cryo-Star HM 560MV, Microm) gebracht und mit einem Gemisch aus Trockeneis und Aqua destillata ummantelt. Das Präparat wurde nach dem Anfrieren der Gelatineplatte mit seiner rostralen Anschnittfläche auf die Gelatinplatte gebracht und mit pulverisiertem Trockeneis rasch überschichtet und durchgefroren. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 40 µm angefertigt und in mehreren Serien in kaltem 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,4 frei schwimmend aufgefangen.

2.4 Grundschrirte der Anfärbung

2.4.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

Zunächst mussten die Paraffinschnitte (Fall 1 und 2) entparaffiniert und rehydriert werden, bevor man die Nissl- oder Immun-Färbung beginnen konnte. Dazu wurden die Schnitte zunächst in Xylol für eine Stunde oder über Nacht inkubiert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch Einstellen in eine absteigende Alkoholreihe (100%-96%-90%-70%) und abschließend in Aqua destillata.

2.4.2 Antigen-Demaskierung

Die Antigen-Demaskierung erfolgt üblicherweise durch feuchte Hitze, die hiermit auf zwei Methoden erfolgreich angewandt wurde: Zunächst wurden die Schnitte in ein Färbegestell einsortiert und in ein mit 0,01 M Na-Citrat Puffer (pH 8,8) gefülltes Gefäß eingestellt und folgendermaßen weiterbehandelt s. unten (Osterwalder).

Bei der **Wasserbadvorbehandlung** werden die Schnitte bei 80°C für 15 min gekocht. Anschließend lässt man die Präparate in der Citratpufferlösung bei Raumtemperatur für 15 min abkühlen (Kawai et al., 1994).

Bei der **Mikrowellenvorbehandlung** kocht man die Schnitte á 5 min mit maximaler Leistung in einem Mikrowellengerät, unter ständiger Kontrolle, damit sie nicht überkocht werden. Anschließend lässt man die Präparate in der Citratpufferlösung bei Raumtemperatur für 15 min abkühlen (McQuaid et al., 1995; Munakata and Hendricks, 1993; Shi et al., 1991).

Anschließend wurden die Schnitte kurz mit A. dest. gespült, bevor nach dreimaligem Pufferwechsel (3x 5 min) in 0,1 M TBS pH 7,6 die Aktivität der endogenen Peroxidasen mit 1% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 30 min blockiert wurden, wodurch unspezifische Anfärbungen verhindert wurden (Bourne, 1983). Nach einer anschließenden dreimaligen Spülung (3x 10 min) in 0,1 M TBS pH 7,4 waren die Präparate für die spezielle Anfärbung mit den gewünschten Primär- und Sekundär-Antikörpern bereit.

Die genauen Arbeitsanweisungen und Protokolle für jede Färbung sind im Anhang (Kap. 5) aufgeführt.

2.5 Spezielle immunhistochemische Anfärbung

2.5.1 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in der Tab. 3 aufgelistet.

2.5.1.1 Cholinacetyltransferase (ChAT)

Cholinacetyltransferase ist ein Enzym, das den Neurotransmitter Acetylcholin synthetisiert (Karow, 2009 b) und nur in bestimmten Zellen vorhanden ist, einschließlich Motoneurone. An Hand dieser Eigenschaften lassen sich cholinerge Motoneurone und Nervenfasern mit Antikörper gegen ChAT nachweisen (Ichikawa and Shimizu, 1998; Oda, 1999; Horng 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen humanes ChAT verwendet (s. Tab. 3).

2.5.1.2 Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG)

Durch die Färbung auf perineuronale Netze, die bestimmte Neurone umgeben, werden Twitch Motoneuronen und internukleäre Neurone von non-Twitch Motoneurone in den Augenmuskelkernen abgegrenzt (Eberhorn et al., 2005; Horng, 2011). Die perineuronalen Netze lassen sich unter anderem mit einem Antikörper gegen Cat-301, ein großmolekulares Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG, 550 kDa), nachweisen. Hier wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen humanes CSPG eingesetzt (s. Tab. 3).

2.5.1.3 Glutamatdecarboxylase (GAD)

Glutamatdecarboxylase (GAD) ist das synthetisierende Enzym des inhibitorischen Transmitters GABA (Königshoff, 2004 a). Die GAD-haltigen Endigungen von Neurone, die am Zellkörper der Neurone im Ncl. abducens sitzen, wurden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen GAD identifiziert (s. Tab. 3).

2.5.1.4 Glycinrezeptor Alpha 1 (GlycRa1)

Der Glycinrezeptor ist ein Proteinkomplex, der die inhibitorischen Signale von Glycin der Zelle vermittelt und an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Der Proteinkomplex besteht aus alpha(α), der 4 Isoformen aufweist (1-4 α), und beta(β) Subtypen (Kuhse et al., 1993). Hier wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Glycinrezeptor alpha 1 α -Subtyp eingesetzt (s. Tab. 3), um die Zellen mit Glycinrezeptoren zu markieren.

2.5.1.5 Nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF)

Mit einem Antikörper gegen nicht-phosphorylierte Neurofilamente (SMI32) können selektiv die Motoneurone in allen Hirnnervenkernen angefärbt werden (Tsang et al., 2000), dafür wurde ein Maus-Antikörper verwendet (Sternberger and Sternberger, 1983) (s. Tab. 3).

Antikörper	Wirt	Antigen	Nummer	Firma	Verdünnung
ChAT	Ziege polyklonal	Cholin-Acetyltransferase	AB 144P	Chemicon Temecula CA	1:50 bzw. 1:100
CSPG	Maus monoklonal	Chondroitin Sulfat Proteoglykan	Clone Cat-301 MAB 5284	Chemicon Temecula CA	1:500
GAD	Maus monoklonal	Glutamat Decarboxylase	GC 3108	Biotrend	1:4000
GlycRα1	Maus monoklonal	Glycinrezeptor Alpha 1	146 111	Synaptic System	1:1000 bzw. 1:800
SMI-32	Mausmonoklonal	Nicht-phosphorylierte Neurofilamente	Clone 02-135 Cat Nr. SMI 32	Sternberger Monoclonals Inc. Luthrevill MD	1:5000

Tab. 3 – Übersicht der verwendeten Antikörper

2.5.2 Immunperoxidase-Methode der Einfachfärbung

Zunächst erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen der Sekundär-Antikörper durch eine Inkubation der Schnitte in 0.3% Triton und 0,1 TBS pH 7,4 mit 5% Normalserum der Herkunftsspezies des Sekundär-Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dann wurden die Schnitte für 48 h bei Raumtemperatur oder über das Wochenende bei 4°C mit dem spezifischen Primär-Antikörper in entsprechendem Normalserum mit 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4 inkubiert. Auf eine gründliche Spülung in 0.1M TBS folgte in einem nächsten Schritt die Reaktion mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper, der gegen die Spezies des Primär-Antikörper gerichtet ist, in 0,1 M TBS mit 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA) für 1 h bei Raumtemperatur (s. Tab.4). Nach dreimaliger Pufferspülung (3 x 10 min) in 0,1M TBS pH 7,4 wurden die Schnitte mit Extravidin-Peroxidase (E-2886, Sigma, Aldrich, St. Louis, MO) in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,1M TBS mit 2% Rinderserumalbumin

(TBS-RSA), die 30 min vorher angesetzt wurde, für 1 h inkubiert. Nach dreimaliger Spülung (3 x 10 min) in 0,1M TBS pH 7,4 erfolgte der Nachweis den Antikörperbindungsstellen entweder durch eine einfache Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion (0.025%) unter Zugabe von H₂O₂ (0.015 %) mit Braunfärbung der Antikörperbindungsstellen oder durch eine intensivierte DAB-Reaktion unter Zugabe von Ammonium-Nickelsulfat, was zu schwarzen Reaktionsprodukten führte (genaue Anleitung s. Anhang Kap. 5). Die Färbeintensität wurde während der Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Spülung der Schnitte mit TBS beendet. Die meisten Einfachfärbungen wurden wegen der stärkeren Anfärbung mit der intensivierten DAB-Reaktion durchgeführt.

Färbung	Präinkubation	Inkubation	biotinylierter Antikörper
ChAT	2% Normal-Hase-Serum	Ziege anti-ChAT 1:50 bzw. 1:100	biot. Hase-anti-Ziege 1:200
CSPG	2% Normal-Pferd-Serum	Maus anti-CSPG 1:500	biot. Pferd-anti-Maus 1:200
GAD	2 % Normal-Pferd-Serum	Maus anti-GAD 1:4000	biot. Pferd-anti-Maus 1:200
GlycRα1	2% Normal-Pferd-Serum	Maus anti-GlycRα1 1:1000 bzw. 1:800	biot. Pferd-anti-Maus 1:200
NP-NF	2% Normal-Pferd-Serum	Maus anti-SMI32 1:5000	biot. Pferd-anti-Maus 1:200

Tab. 4 - Übersicht der Antikörper der speziellen Immunhistochemie der Einfachfärbungen und deren Verdünnung

2.6 Entwässern und Eindeckeln

Nach einer gründlichen Spülung (3 x 10 min) in 0,1M TBS pH 7,4 wurden die freischwimmenden Schnitte (Fall 3) zunächst auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die bereits aufgezogenen Paraffinschnitte konnten direkt weiter behandelt werden. Paraffinschnitte und getrocknete Gefrierschnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-90%-96%-100%) entwässert und danach für 30 min in Xylol eingelegt. Anschließend wurden die Schnitte mit „DPX Mountant for Histology“ (Fluka 44581) eingedeckelt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.7 Immunperoxidase-Methode zur Doppelfärbung

Die Schritte der Doppelfärbungen entsprechen den Schritten der Einfachfärbungen. Die Immunfärbungen erfolgen hierbei nacheinander. Jede Doppelfärbung begann immer mit dem Nachweis von Cholinacetyltransferase (ChAT) und als zweiter Schritt folgte die Anfärbung der perineuronalen Netze, GAD-haltigen Endigungen oder Glycinrezeptoren (s. Tab. 5). Die Darstellung des ersten Antikörpers (ChAT) erfolgte immer mit der Nickel-intensivierten DAB-Reaktion, was zu schwarz gefärbten cholinergen Zellkörpern führte. Nach einer gründlichen Waschung (3 x 10 min) mit 0,1M TBS bei pH 7,4, folgte die zweite Einfachfärbung auf CSPG, GAD oder GlycR α 1. Zunächst wurde die verbliebene Restaktivität von Peroxidase mit 1% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 30 min blockiert, bevor die Schnitte nach Blockierung im Normalserum mit dem zweiten Primär-Antikörper (CSPG oder GAD oder GlycR α 1) über 48 h bei Raumtemperatur oder über das Wochenende bei 4°C inkubiert wurden. Danach erfolgte die Visualisierung der Strukturen durch erneute DAB-Reaktion ohne Nickel (s. Kap. 2.5.2), hierbei wurde der lösliche Chromogen-Komplex durch enzymatische Reaktion von GAD oder CSPG oder GlycR α 1 mit dem Substrat Wasserstoffperoxid zu einem leicht identifizierenden braun-granulären Reaktionsprodukt oxidiert. Die Strukturen wurden als braune Pünktchen (GAD, GlycR α 1) oder braunes Netzwerk (CSPG) dargestellt.

I. Färbung und Erscheinung der Strukturen	II. Färbung und Erscheinung der Strukturen	Zweck der Färbung
ChAT mit DAB-Ni (schwarz)	CSPG mit DAB (braun)	Identifizierung der Zellen
ChAT mit DAB-Ni (schwarz)	GAD mit DAB (braun)	Bestimmung der GAD-haltigen Endigungen (Ziel des Projektes)
ChAT mit DAB-Ni (schwarz)	GlycR1 mit DAB (braun)	Bestimmung der Glycinrezeptoren (Ziel des Projektes)

Tab. 5 - Übersicht der Kombinationen der Einfachfärbungen, die für die Doppelfärbung gekoppelt wurden

2.8 Nisslfärbung

Die Nisslfärbung ist die klassische Färbemethode zur Darstellung der Zytoarchitektur einschließlich der Zellmorphologie (s. Abb. 10). Mit dieser Färbung wurden von jedem Fall Schnittserien erstellt, um den Ncl. abducens zu identifizieren und seine räumliche Ausdehnung zu studieren. Diese Schnitte dienten hauptsächlich als Referenzpräparate zu den immunocytochemisch angefärbten Schnitten. Hierzu wurden die Schnitte zunächst entfettet und in einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Die Färbung erfolgte in einer 0,5%-igen Kresylviolettacetatlösung, wobei der Farbstoff an basophile Verbindungen wie RNA und DNA bindet und daher die Ribosomen und Nukleoli blau oder violett anfärbt. Diese Zellorganellen sind im Nervengewebe nur im Zellkörper vorhanden, dadurch werden nur die Zellkörper durch die so genannten „Nissl-Schollen“ dargestellt, nicht aber die Fortsätze. Diese Schollen entsprechen dem eigentlichen rauen endoplasmatischen Retikulum, das mit Ribosomen vollbeladen ist (Röhlich, 2002). Über essigsaures Wasser und eine aufsteigende Alkoholreihe wird die Farbe wiederum teilweise herausgewaschen, d.h. differenziert, und nach der Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Inkubation in Xylol mit „DPX Mountant for Histology“ eingedeckelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.9 Auswertung

Für dieses Projekt wurden drei repräsentative Ebenen (caudale, mittlere, rostrale) durch den Ncl. abducens ausgewählt und untersucht. Für die Auswertung wurden die Zellen auf den drei Schnittebenen von den Fällen 1 und 2 benutzt. Die freischwimmenden Schnitte von Fall 3 dienten nur der Visualisierung der Ebenen des Ncl. abducens als Musterbild von verschiedenen Färbungen (s. Abb. 10).

2.9.1 Bildaufnahme und Digitalisierung

Die Übersichtsaufnahmen vom Ncl. abducens wurden mit einer Digitalkamera (Mikrofire) angefertigt, die auf einem Forschungsmikroskop (Axioplan; Zeiss), montiert und mit einem Computer verbunden ist. Nach der Bearbeitung von Helligkeit und Kontrast durch eine Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CS4, Adobe System Incorporated, San Jose, CA), - nur so weit, dass es dem Bild im Mikroskop entsprach - wurden die Einzelbilder mit einer Software (PanaVue Imageassembler, Panavue, Kanada) zur Übersichtsaufnahmen zusammengesetzt. Die Detailaufnahmen wurden mit einer Digitalkamera (Pixera Pro 600ES; Klughammer), die auf einem Lichtmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) sitzt, aufgenommen. Die Detailphotographien erfolgten mit

standardisierten Einstellungen der Digitalkamera mit Hilfe der Software Viewfinder (Auflösung: 1392x1040; Exposuretime: 60 sec.; Sensitivity: 100). Die weitere Bearbeitung sowie Beschriftung und Druck-Lay-Out der Bilder erfolgte mit dem Zeichenprogramm Corel Draw (Corel Draw X4, Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada).

2.9.2 Identifizierung der Neurone

Zunächst wurden die Neurone im Ncl. abducens durch eine Doppelfärbung (ChAT mit CSPG s. Kap. 2.7) identifiziert und an Hand ihrer unterschiedlichen Färbeeigenschaften in Untergruppen (Twitch, non-Twitch Motoneurone und internukleäre Neurone) eingeteilt (Eberhorn et al., 2005; Horng, 2011) (s. Tab. 6; Abb. 7). Die klassifizierten Neurone wurden dann in doppelt gefärbten Nachbarschnitten mit Hilfe von Landmarken, wie Blutgefäße, aufgesucht und auf GAD- oder GlycR α 1-positive Eingänge untersucht. Dazu wurden zunächst in Übersichtsaufnahmen (10fach) von benachbarten Schnitten die identischen Zellen aufgesucht und durchnummeriert. Dann wurde die genaue Identifizierung der Zellen mithilfe der Software Photo Shop von der Firma Adobe (Adobe Photoshop CS4, Adobe System Incorporated, San Jose, CA) überprüft. Die digital erstellten Bilder wurden via Layer anhand der Landmarken übereinander gelegt und durch die Veränderung der Transparenz die Lokalisation und Identität der Zellen kontrolliert. Anschließend wurde jede einzelne Zelle unter dem Mikroskop ausgewertet.

	CSPG	ChAT
Twitch Motoneurone	+	+
non-Twitch Motoneurone	-	+
internukleäre Neurone	+	-

Tab. 6 - Übersicht der Färbeeigenschaften der Neurone für die Identifizierung dieses Projektes

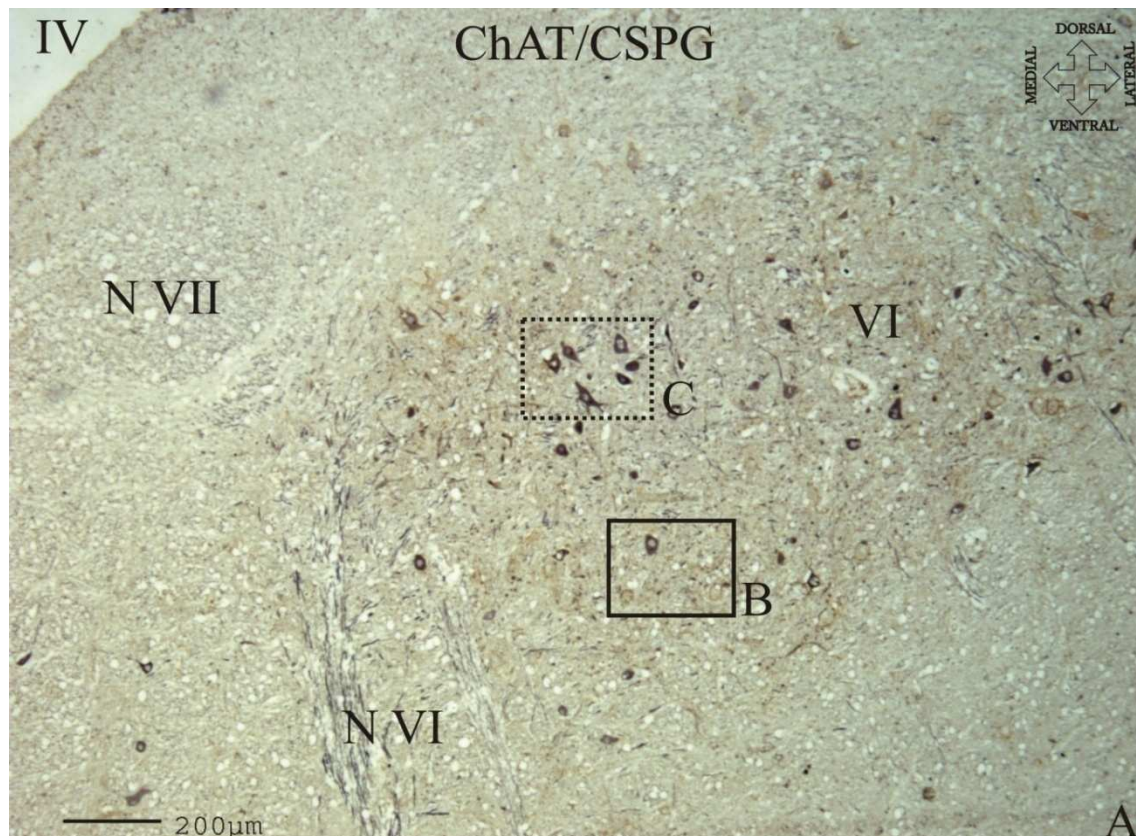


Abb. 7 – Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun)

Bild A: Übersichtsaufnahme von einem Transversalschnitt durch den rechten Ncl. abducens auf mittlerer Höhe (Fall 1), der auf ChAT (schwarz) und perineuronale Netze (braun) angefärbt wurde (IV – IV.Ventrikel; N VII-Nervus facialis; VI-Nucleus abducens; N VI-Nervus abducens).

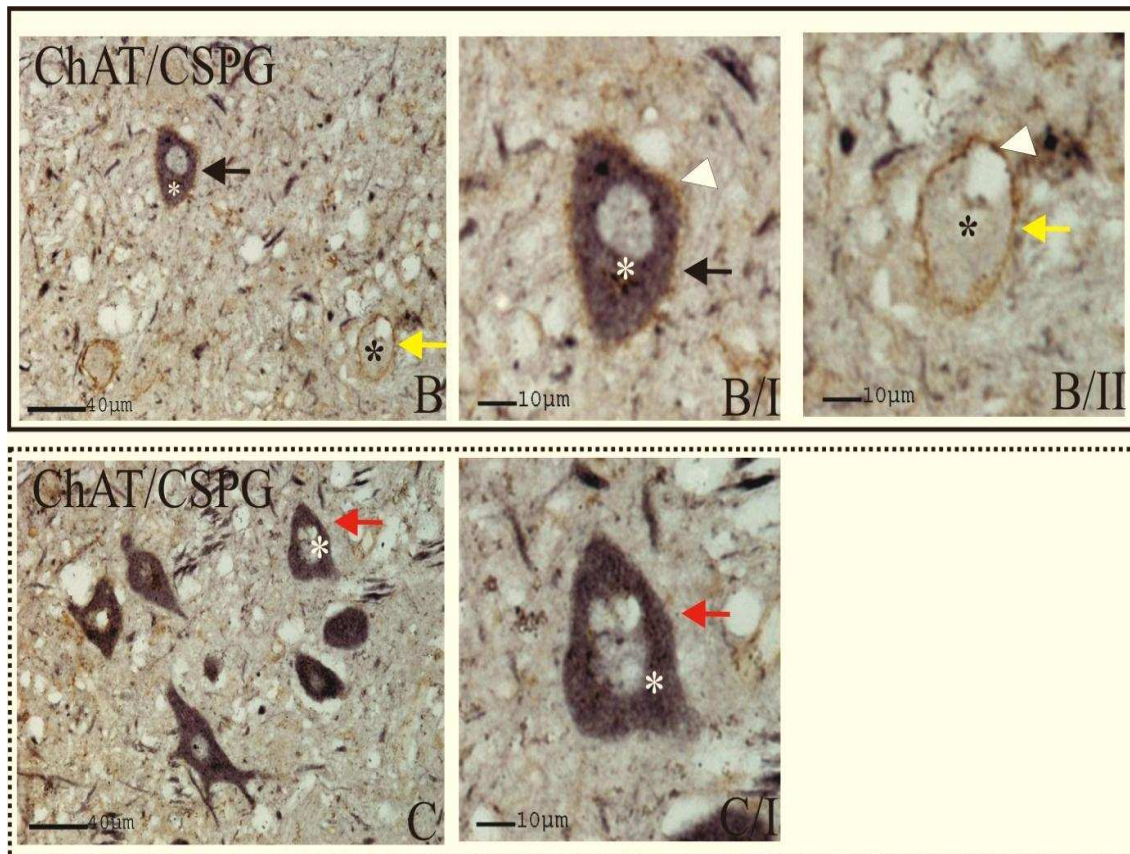


Bild B: Detailaufnahme des auf Bild A markierten Areals B (ChAT/CSPG Doppelfärbung) mit putativen Twitch Motoneurone (schwarzer Pfeil) und internukleären Neurone (gelber Pfeil). **Bild B/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: Darstellung eines cholinergen (weißer Stern) Twitch Motoneurons (schwarzer Pfeil) mit perineuronalen Netze (PNN) (weißer Pfeilspitze) als Detail von Bild B. **Bild B/II:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: Darstellung eines nicht-cholinergen (schwarzer Stern) internukleären Neurons mit PNN (weißer Pfeilspitze) als Detail von Bild B.

Bild C: Detailaufnahme des auf Bild A markierten Areals C (ChAT/CSPG Doppelfärbung) mit putativem non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil). **Bild C/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: Darstellung eines cholinergen (weißer Stern) non-Twitch Motoneurons als Detail von Bild C.

2.9.3 Quantitative Analyse der Glutamatdecarboxylase(GAD)-haltigen Endigungen

Zur quantitativen Analyse der GABAergen Eingänge wurde die Zahl der GAD-haltigen Punctae pro Zellumfang an den verschiedenen Zellpopulationen (Twitch, non-Twitch Motoneurone, internukleäre Neurone) des Ncl. abducens bestimmt. Dabei wurden alle auswertbaren Zellen analysiert und keine Unterscheidung bezüglich der Ebene durch den Ncl. abducens gemacht. Nach der Identifizierung erfolgte eine auf die Zelle fokussierte Bildaufnahme der Doppelfärbungen (ChAT mit GAD). Anhand dieses digitalen Bildes wurde der Zellumfang am Monitor mithilfe einer Software für Zellprofilmessung (Image J / Image Processing and Analysis in Java, Autor: Wayne Rasband, Maryland USA) bestimmt. Manuell erfolgte dann die genaue Auszählung der braunen GAD-positiven Endigungen am Monitor, die auch unter dem Mikroskop kontrolliert wurden. Die Werte wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel; Microsoft Corporation, USA) übertragen und dort als Endigungen pro gemessenen μm berechnet.

2.9.4 Qualitative Analyse der Glycinrezeptor Alpha 1 (GlycRa1)

Die GlycR α 1-Einfachfärbungen dieses Projektes wurden nicht quantitativ, sondern qualitativ ausgewertet, da sich die Färbungen nicht auf Nervenendigungen beschränkten, sondern eher die gesamte postsynaptische Membran erfasste. Dementsprechend wurde bei der Analyse nur erfasst, ob GlycR α 1-Immunoreaktivität an den einzelnen Zellpopulationen (Twitch, non-Twitch Motoneurone und internukleäre Neurone) nachgewiesen wurde oder nicht. Sowohl die Färbeintensität als auch die Dichte der Glycinrezeptoren wurde nicht weiter analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Technische Probleme

Bei der histologischen Aufarbeitung entstanden Artefakte, die zu Problemen bei der Auswertung führen könnten und kritisch betrachtet und berücksichtigt werden mussten.

3.1.1 Färbeverhalten der menschlichen Fällen

Viele Parameter tragen dazu bei, dass sich die Schnitte von menschlichen Gehirnen nicht immer einfach und gleichmäßig anfärben lassen. Dazu zählt die post-mortem Zeit, die Zeitspanne vom Tod des Individuums bis zur Gewebsentnahme und Fixierung in Formalin. Eine übermäßig lange Lagerung des Gewebes in Formalin führt zu einer schlechten Anfärbbarkeit des Gewebes (Tahan et al., 1995; Werner et al., 2000). Es müssen z.T. Antigen-Demaskierungsmethoden angewendet werden, um die Antigene wieder freizulegen (Osterwalder; Kawai et al., 1994; Shi et al., 1991).

3.1.2 Verdünnung der Antikörper

Die Herstellerfirmen der Antikörper empfehlen eine von ihnen erprobte Verdünnung, die oft wegen der unterschiedlichen Vorbedingungen des Gewebes nicht immer funktioniert. Dadurch wurde für jeden Fall und Antikörper eine Verdünnungsreihe durchgeführt und die Verdünnung an das Projekt angepasst. Diese Austestung ermöglichte die Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration, um eine bestmögliche Färbung zu erzielen (s. Tab. 3 und 4).

3.1.3 Randeffekt

Es wurde beobachtet, dass im Bereich der Schnittränder die Immunfärbung schwächer ist als im Zentrum, was möglicherweise auf eine „Überfixierung“ durch Formalin, das beim Einlegen des Gehirns von außen nach innen vordringt, zurück zu führen ist. Der Randeffekt, der zu Anfärbungsfehlern führte, zeigt sich in der Übersichtsaufnahme, d.h. das dorsal an dem IV-Gehirnventrikel anliegende Areale heller erschienen (s. Abb. 8). Dieses Problem tauchte nur bei der Färbung der Parafinschnitte auf. Aus diesem Grund wurden die Neurone von dem helleren dorsalen Areal mit den Neurone von dem dunkleren ventralen Areal verglichen. Dazu wurden die Präparate mit der ChAT - und CSPG -Färbung unter dem Mikroskop systematisch untersucht und verglichen. Eine kritische Analyse der ChAT- und GAD - Färbungen, die das Hauptziel der Arbeit bilden, zeigte, dass nur die Färbeintensität in den Bereichen variierte, nicht aber die quantitative Färbung. Aus diesen Gründen wurden auch die Neurone von helleren Arealen in die Auswertung dieser Doktorarbeit miteinbezogen.

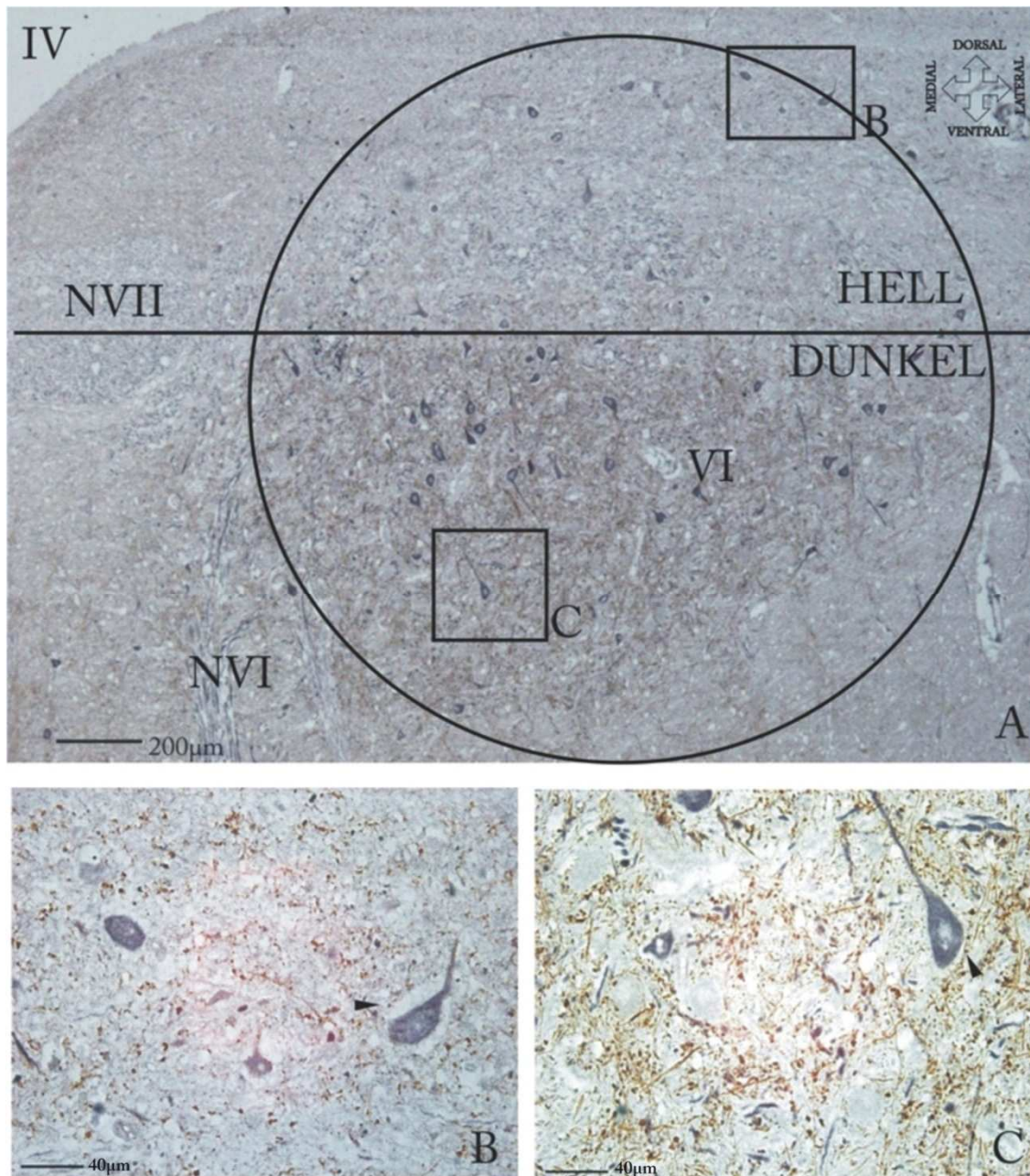


Abb. 8 - Demonstration der unterschiedlichen Färbintensitäten der Immunfärbungen im Nucleus abducens

Bild A: Übersichtsaufnahme eines Transversalschnittes durch den rechten Ncl. abducens in der mittleren Ebene vom Fall 1 (ChAT/GAD Doppelfärbung; IV – IV.Ventrikel; N VII-Nervus facialis; VI- Ncl. abducens; N VI - Nervus abducens).

Bild B: Detailbild vom helleren Areal.

Bild C: Detailbild vom dunkleren Areal.

In beiden Bereichen finden sich gleichermaßen viele GAD-positive Punctae (schwarze Pfeilspitze).

3.1.4 Schrumpfung durch die histologische Aufarbeitung

Durch die Fixierung und die Entwässerung für die Paraffineinbettung schrumpfte das Gewebe beträchtlich, was sich darin zeigte, dass viele geschrumpfte Neurone mehr oder weniger große Spalträume im Neuropil hinterließen. Eine konsequente Messung des Zellumfangs entlang dem Zellumriss hätte regelmäßig zu kleineren Werten für die Umfänge geführt (s. Abb. 9 - Bild A und B). Deshalb wurde eine Modifikation der Umfangmessung entwickelt und in Vergleichsmessungen als geeignet verifiziert. Folgendes Vorgehen hat sich als praktikabel erwiesen: Das Umfahren der Zelloberfläche mit dem Cursor wurde immer auf halben Weg zwischen der geschrumpften Zelle und dem äußeren Spaltraum zum umgebenden Neuropil vollzogen (intuitive Zellgröße). Zuvor waren zwei Vergleichsmessungen durchgeführt worden: einmal entlang des äußeren Spaltraumes und einmal entlang der Zelloberfläche der geschrumpften Zellen. Aus diesen zwei Werten wurde ein statistischer Mittelwert errechnet, um eine annähernd reale Zellgröße zu bestimmen (objektive Zellgröße) (s. Abb. 9 - Bild B). Dieser objektiv bestimmte Zellumfang wurde mit der konsequent durchgeführten Näherungsmessung (intuitiv) an 10 Zellen verglichen, wobei sich keines wesentlichen Unterschiede feststellen ließen (s. Diagr. 1). Sehr stark geschrumpfte Zellen mit sehr schlecht bestimmbar Zellumfang wurden nicht in die Auswertung einbezogen (s. Abb. 9 - Bild A/ roter Pfeil/ und C).

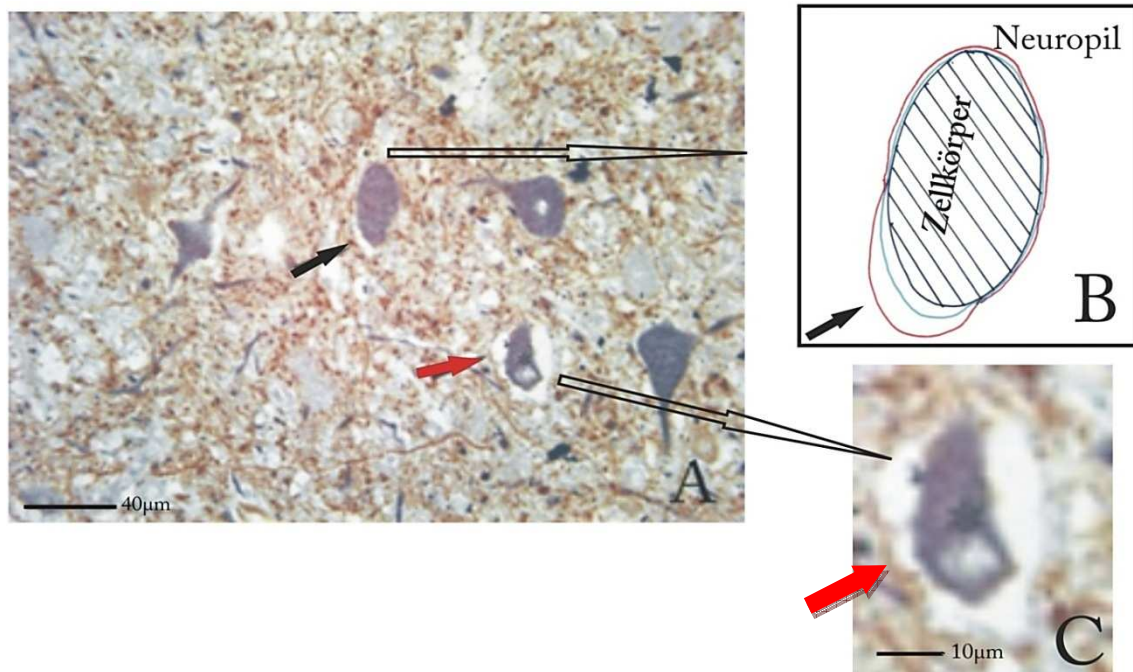
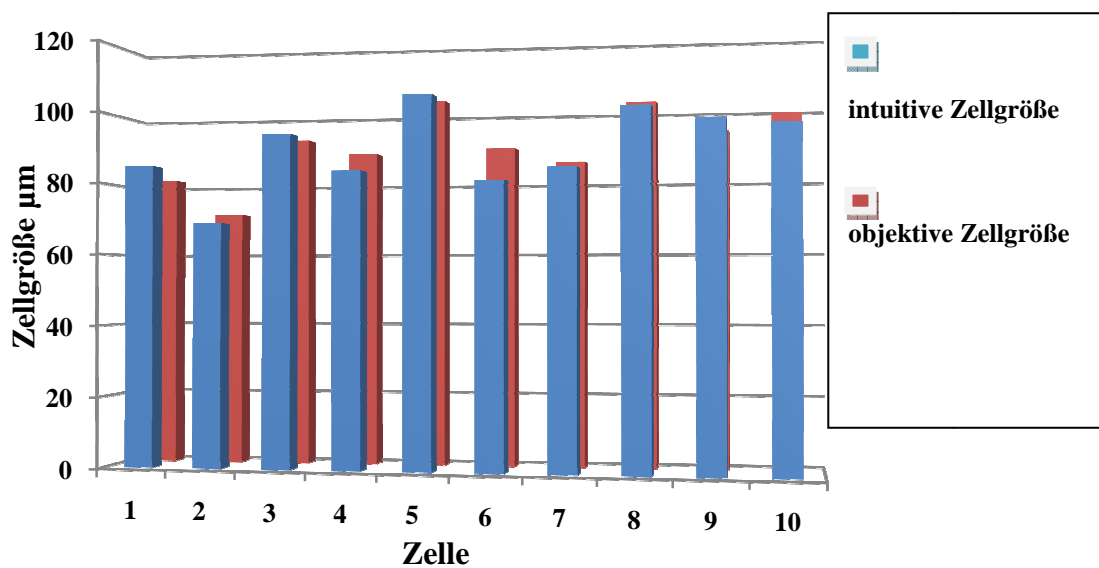


Abb. 9 - Darstellung der Schrumpfung der Zellen und deren Beseitigung

Bild A: (ChAT / GAD Doppelfärbung) - Pfeil (schwarz) = Vakuole an dem Zellkörper; Pfeil (rot) = stark geschrumpfte Zelle, die nicht ausgewertet wurde.

Bild B: schematische Darstellung des Zellkörpers mit Vakuole - Pfeil (schwarz) = Vakuole an dem Zellkörper; blaue Linie = auf dem halben Weg (intuitive Zellgröße); rote Linie = äußere Grenze der Vakuole; schwarze Linie = geschrumpfte Zellgrenze; (die objektive Zellgröße wurde von der roten und schwarzen Linie berechnet).

Bild C: stark geschrumpfte Zelle, die nicht ausgewertet wurde



Diagr. 1 - Vergleich verschiedener Messmethoden

3.2 Histologische Darstellung des Nucleus abducens

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden vom Fall 3 Gefrierschnitte für die histologische Darstellung des Ncl. abducens mit dessen Färbeverhalten in drei transversalen Schnittebenen erstellt und zur Demonstration genutzt. An freischwimmenden Präparaten kann eine bessere intensivere Färbung erzielt werden als an aufgezogenen Paraffinschnitten, da sie besser von beiden Seiten mit den Antikörper und dem Farbstoff durchdrungen werden. Dazu zeigt Abb. 10 in Übersichtsbildern auf drei repräsentativen Ebenen das Erscheinungsbild des Ncl. abducens in der Nisslfärbung (Bild A / I, II, III), in der immunhistochemischen Färbung auf GAD (Bild B / I, II, III), nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF) (Bild C / I, II, III) und GlycR1 (Bild E / I, II, III). Die Nisslfärbung zeigt, dass der Ncl. abducens anhand seiner großen dunkel gefärbten Zellkörper sich gut von seiner Umgebung abhebt. Auf caudalen Ebenen erscheint er etwas queroval, wird aber nach rostral zunehmend kleiner und runder (Bild A / I, II, III). Der Form des Kerns ließ sich in allen Immunfärbungen gut darstellen. Die Zellsomata dieser Motoneurone im Ncl. abducens haben einen Durchmesser von ca. 50µm und eine Dendritendichte von 12-20 pro Nervenzell (Szabo et al., 1987). Die NP-NF Immunfärbung markiert das Stützgerüst der Neurone und zeigt deren Dendriten und Axone in ihrem Verlauf (Bild C / I, II, III). Man sieht auf der mittleren und rostralen Ebene, dass der Nervus abducens (N.VI) ventromedial aus dem Kern austritt, um dann am Ponsunterrand den Hirnstamm zu verlassen. Durch die GAD-Färbung und Glycin-Färbung ließ sich der Kern in allen Ebenen deutlich abgrenzen, was bedeutet, dass der Ncl. abducens reich mit GABAergen und glycinergen Endigungen versorgt ist, deren Nachweis die Zielsetzung dieses Projektes ist. Die weitere Analyse der funktionellen Neuronengruppen erfolgte anhand der immunhistochemischen Färbungen vom Fall 1 bzw. 2 s.u.

Bild A/I, A/II, A/III

(Nisslfärbung)

Darstellung der Zellkörper der Neuronen

Bild B/I, B/II, B/III

(GAD-Färbung)

Darstellung der Glutamatdecarboxylase-haltigen Endigungen

Bild C/I, C/II, C/III

(SMI32-Färbung)

Darstellung der nicht-phosphorylierten Neurofilamenten (Neuronen gesamt mit Axonen und Dendriten)

Bild D/I, D/II, D/III

(GlycR1-Färbung)

Darstellung der postsinaptischen Glycin-Rezeptoren

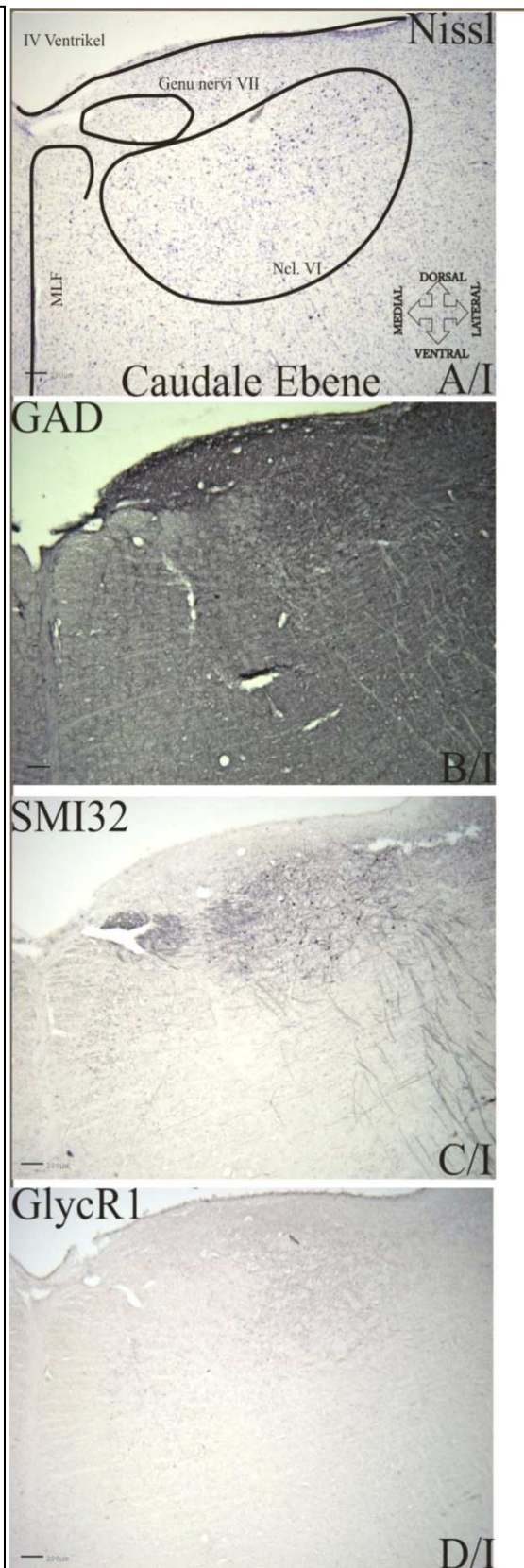
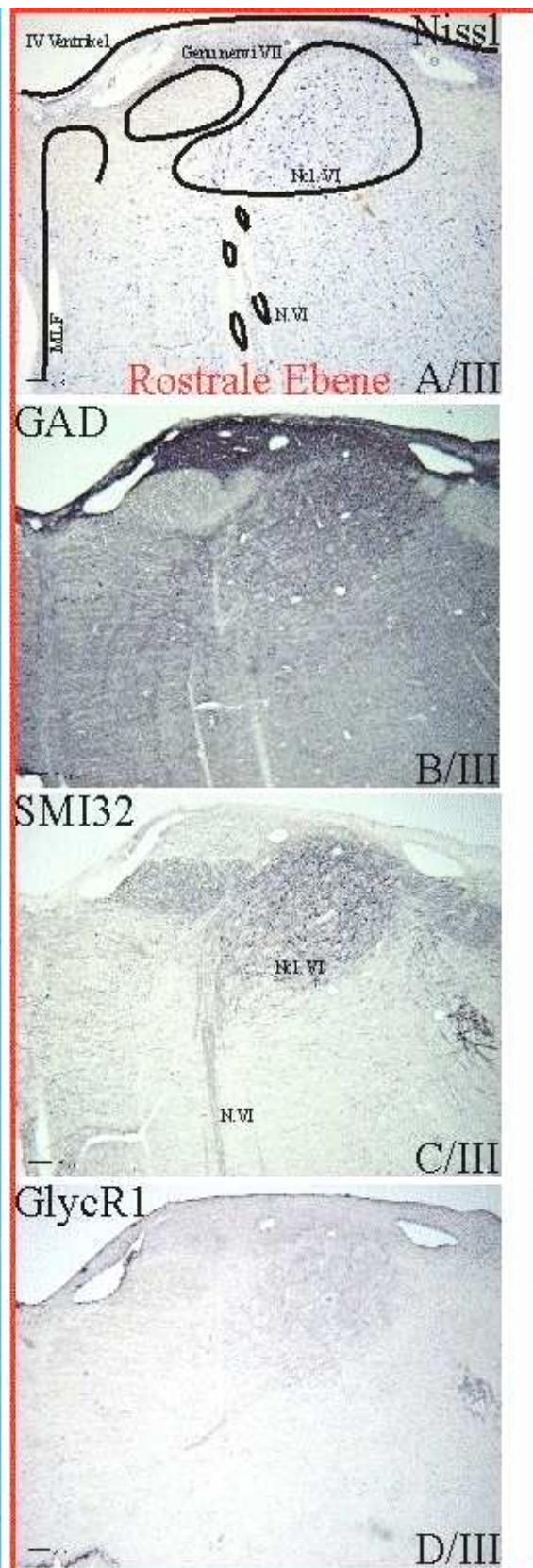
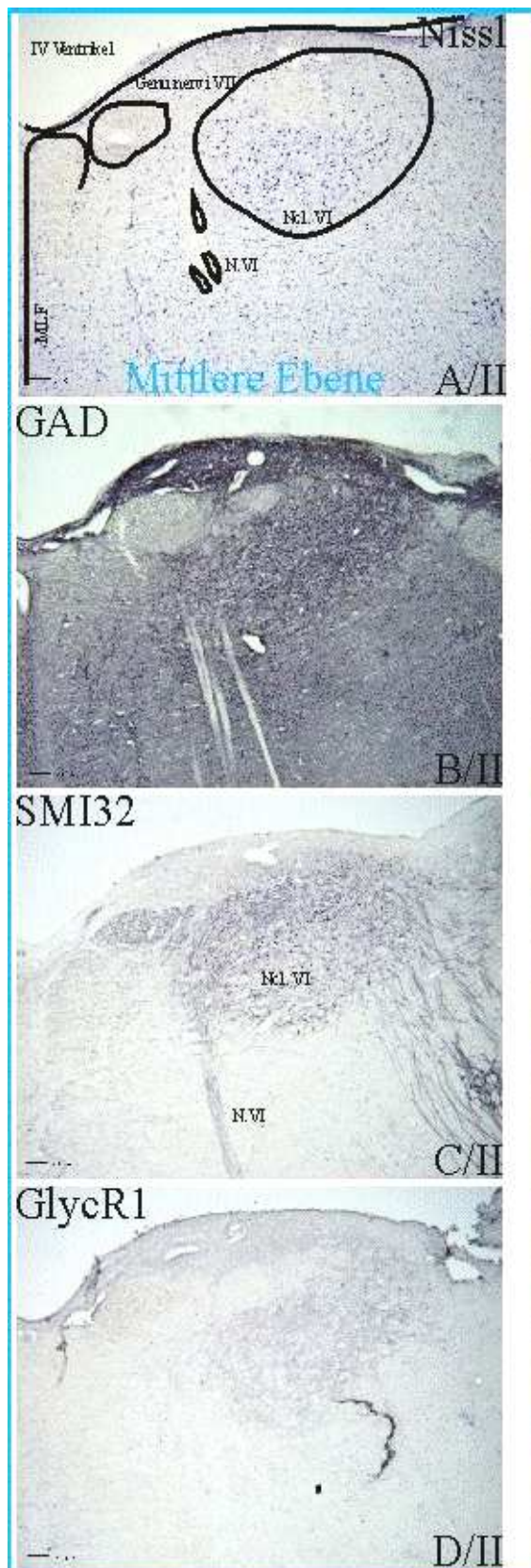


Abb. 10 - Transversalschnitte durch den rechten Nucleus abducens in drei Ebenen (caudo-rostral)

(I- Caudale Ebene;II- Mittlere Ebene;III- Rostrale Ebene) anhand verschiedener Färbungen von Nachbarschnitten (IV – IV. Ventrikel; VI-Ncl. abducens; N VI-Nervus abducens; MLF-Fasciculus longitudinalis medialis) Maßstab 200µm;



3.3 Cholinacetyltransferase (ChAT) und Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG)

Doppelfärbung im Nucleus abducens

Mit der ChAT/CSPG-Immunperoxidase-Doppelfärbung lassen sich die putativen cholinergen Motoneurone anhand ihrer schwarzen Zellsomata von den nicht-cholinergen Neurone, die vermutlich internukleäre Neurone darstellen, abgrenzen. Die braune CSPG-Immunfärbung findet sich nur an einem Teil der Neurone, die perineuronale Netze besitzen, und erlaubt die Einteilung in die funktionellen Neuronengruppen des Ncl. abducens: Twitch Motoneurone mit schwarzen Zellkörper und braunen CSPG-Netzen, non-Twitch Motoneurone mit schwarzen Zellkörper ohne CSPG-Netze und internukleäre Neurone mit ungefärbten Zellkörper und CSPG-Netze. Alle Zelltypen waren auf allen Schnittebenen vorhanden, wobei anhand des Färbemusters nicht zwischen (PMT)-Gruppen- und internukleären Neurone unterschieden werden konnten. (s. Abb. 11- Twitch Motoneuron B1/I und C1/II; non-Twitch Motoneuron C1/I; internukleäre Neurone B1/II ; s. Abb. 13 - Twitch Motoneuronen B1/I; internukleäre Neurone B1/II) (Horng, 2011).

3.3.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)

Die cholinergen Motoneurone verteilen sich gleichmäßig im Ncl. abducens und lassen sich anhand der zusätzlichen CSPG-Färbung in der ChAT/CSPG Doppelfärbung in zwei Untergruppen einordnen. Wie bereits vorher beschrieben fand sich eine Gruppe mit etwas größeren polygonalen Zellkörper mit perineuronalen Netze homogen verteilt im gesamten Ncl. abducens (Horng, 2011). Die zweite Gruppe der Motoneurone, die keine perineuronale Netze tragen, besitzen eher kleine runde Zellkörper und liegen vornehmlich im medialen Abschnitt. Sie wurden als putative non-Twitch Motoneurone betrachtet (s. Abb. 11- Twitch Motoneuron B1/I und C1/II; non-Twitch Motoneuron C1/I; s. Abb. 13- B1/I Twitch Motoneuron) (Horng, 2011).

Insgesamt machte die Motoneuronenpopulation 83-90% aus (GAD-Projekt: Fall 1 – 83 %; Fall 2 – 90 %; GlycR α 1 - Projekt: Fall 1 – 85 %) und davon konnte man 57-75 % der Neurone als putative Twitch (GAD-Projekt: Fall 1 – 57 %; Fall 2 – 75 %; GlycR α 1-Projekt: Fall 1 – 67 %/ s. Tab 7; 9/) und 15-26% als non-Twitch Motoneurone (GAD-Projekt: Fall 1 – 26 %; Fall 2 – 15%; GlycR α 1-Projekt: Fall 1 - 18%/ s. Tab 7; 9/) klassifizieren.

3.3.2Internukleäre Neuronen (III)

Anhand der ChAT/CSPG Doppelfärbungen ließen sich nicht-cholinerge Neurone, die aber perineuronale Netze tragen, von cholinergen Motoneurone unterscheiden. Diese Neurone werden als putative internukleäre Neurone betrachtet und scheinen beim Menschen vermischt mit der Motoneurone ohne klare räumliche Trennung im Ncl. abducens zu liegen. (s.Abb. 11 – internukleäre Neurone B1/II; s. Abb. 13- B1/II Internukleäre Neurone) (Horng, 2011).

Insgesamt ließen sich ca. 10%-17% (GAD-Projekt: Fall 1 - 17%; Fall 2 – 10% ;GlycR α 1-Projekt: Fall 1 - 15%/ s. Tab 7; 9/) der Neurone als putative internukleäre Neurone identifizieren.

3.3.3Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neuronen (IV)

Die PMT-Neurone, die partiell im rostralen Bereich des Ncl. abducens lokalisiert sind, weisen bei der ChAT/CSPG Doppelfärbung identische Färbereigenschaften und Zellformen wie die internukleären Neurone auf. Sie lassen sich durch diese Färbung nicht von den internukleären Neurone unterscheiden. Deshalb wurde diese Neuronengruppen im Rahmen dieses Projektes von der internukleären Neurone nicht abgegrenzt und auch nicht näher untersucht.

3.4 Glutamatdecarboxylase(GAD)-Färbung im Nucleus abducens

Nach der Einteilung, Identifizierung und Beseitigung der Fehlermöglichkeiten erfolgte anhand einer ChAT/GAD Doppelfärbung die Bestimmung der Dichte von GAD-haltigen Endigungen, die an der Zelloberfläche und Dendriten der Neurone im Ncl. abducens enden und als braune Punkte markiert wurden. Der Ncl. abducens wurde beidseits anhand dreier transversaler Schnittebenen von rostral nach caudal analysiert. Unter dem Mikroskop zeigten die untersuchten Präparate ein einheitliches Bild, dass alle Zellpopulationen (s. Abb. 11- ; Twitch Motoneuron B2/I; non-Twitch Motoneuron C2/I; internukleäre Neurone B2/II) ebenfalls gleichmäßig mit GAD-positiven Punctae versorgt sind. Zur Verifizierung der visuellen Eindrücke erfolgte eine genaue quantitative Analyse. Die meisten Zellen konnten in der mittleren Ebene aufgefunden werden. Dieses Erscheinungsbild könnte sowohl an der schrägen transversalen Schnittfläche als auch an der Abnahme der Kerngröße des Ncl. abducens liegen. Die quantitativen und qualitativen Unterschiede der verschiedenen Ebenen wurden nicht weiter analysiert. Die GAD-positiven Punctae auf den Dendriten der verschiedenen Zellpopulationen wurden ebenfalls erfasst. Diese Dendriten waren nur spärlich aufzufinden, und diese Befunde müssen deshalb kritisch betrachtet werden.

Insgesamt wurden in diesem Projekt 271 Zellen vom Fall 1 und 79 Zellen vom Fall 2 mit der ChAT/GAD Doppelfärbung analysiert. Nach der Bestimmung der für dieses Projekt wichtigen Parameter erfolgte eine statistische Analyse. Die Anzahl der ausgezählten GAD-haltigen Endigungen wurde mit der gemessenen Strecke (intuitive Zellgröße) der Zelloberfläche dividiert, so erhielt man einen statistischen Wert (Anzahl der GAD-haltigen Endigungen / gemessene Strecke), der für die bessere Präsentation genutzt werden konnte. Für jede Zellpopulation wurde dieser Wert bestimmt und der statistische Mittelwert aus diesen Daten errechnet, damit man die Zellpopulationen miteinander vergleichen konnte. Je kleiner der Zellumfang und je größer die GAD-Dichte ist, desto größer ist dieser Wert. Das bedeutet, dass die Zelle mit vielen GAD-haltigen Endigungen versorgt ist. Beim Fall 2 waren diese Werte etwas kleiner als die Werte vom Fall 1. Es könnte an der schlechteren Anfärbbarkeit (s. Kap. 3.1.1) dieser Präparate liegen. Trotzdem waren die Werte für dieses Projekt nutzbar, da alle Zellpopulationen und Strukturen generell schwächer markiert wurden, d.h. die Dichte der GAD-haltigen Endigungen bei allen Zellen kleiner war (s. Tab. 7; Diagr. 2). Dadurch bleibt das Verhältnis konsequent zwischen den Zellpopulationen gleich und dem Fall 1 entsprechenden Ergebnisse widerspiegelt.

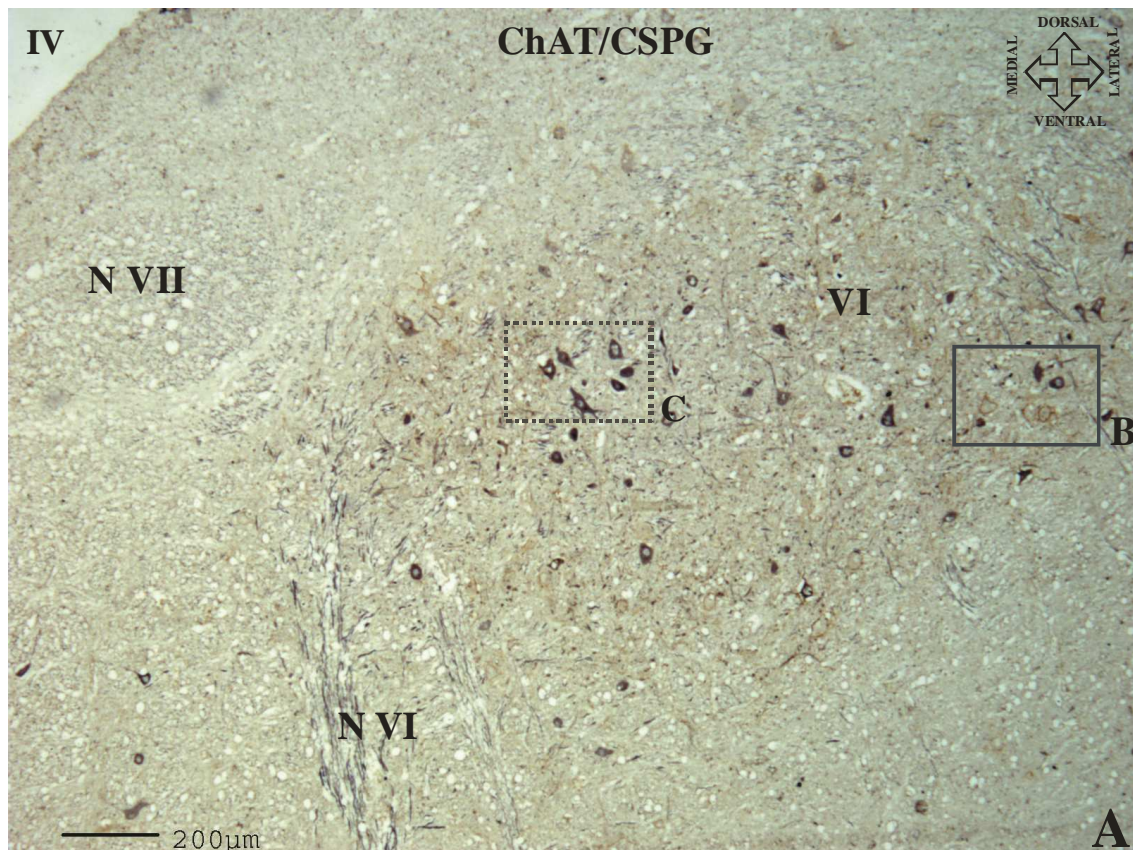


Abb. 11- Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder GAD (braun)

Bild A: Übersichtsaufnahme von einem Transversalschnitt durch den rechten Ncl. abducens auf mittlerer Höhe (Fall 1), der auf ChAT (schwarz) und perineuronale Netze (braun) angefärbt wurde, für die Repräsentation der Lokalisation der Zellen (IV – IV.Ventrikel; N VII-Nervus facialis; VI-Nucleus abducens; N VI-Nervus abducens).

Bild B: Detailaufnahme des auf dem Bild A markierten Areals B. **Bild B1:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: zwei Twitch Motoneurone (schwarzer Pfeil) und drei putative internukleäre Neurone (gelber Pfeil). **Bild B1/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: cholinerges Twitch Motoneuron (weißer Stern) mit perineuronalen Netze (weiße Pfeilspitze) als Detail vom Bild B1. **Bild B1/II:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: nicht-cholinerge internukleäre Neurone (schwarzer Stern) mit perineuronalen Netze (weiße Pfeilspitze) als Detail von Bild B1. **Bild B2:** ChAT/GAD Doppelfärbung: Twitch Motoneurone und internukleäre Neurone vom Areal B. **Bild B2/I:** ChAT/GAD Doppelfärbung: Twitch Motoneurone wie im Bild B1/I im Detail von Bild B2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarze Pfeilspitze). **Bild B2/II:** ChAT/GAD Doppelfärbung: putative internukleäre Neurone wie im Bild B1/II im Detail von Bild B2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarze Pfeilspitze).

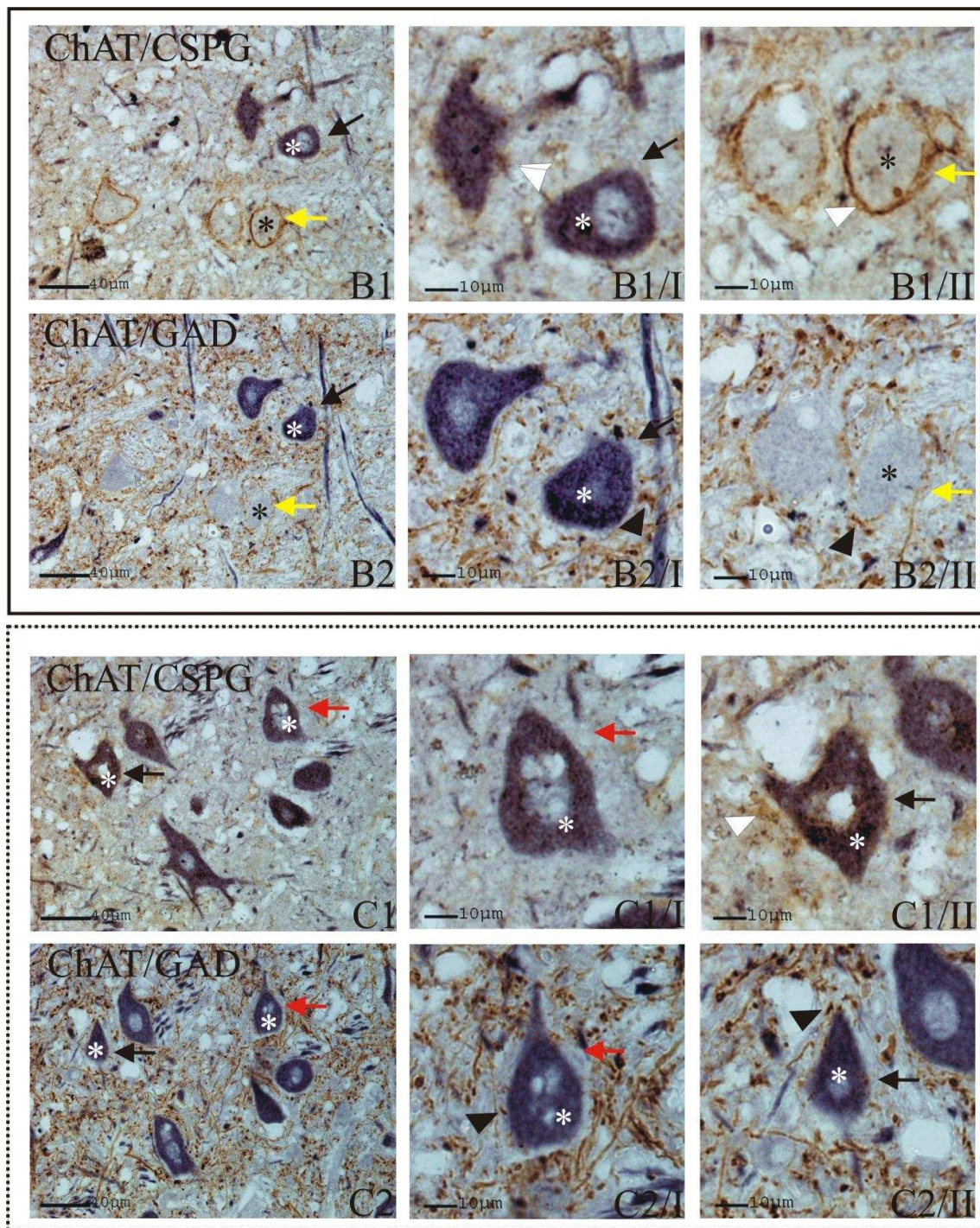


Bild C: Detailaufnahme des auf Bild A markierten Areals C. **Bild C1:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: Twitch Motoneuron (schwarzer Pfeil) und non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil). **Bild C1/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: cholinerges (weißer Stern) non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil) im Detail von Bild C1. **Bild C1/II:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: cholinerges (weißer Stern) Twitch Motoneuron (schwarzer Pfeil) mit perineuronalen Netze (weiße Pfeilspitze) im Detail von Bild C1. **Bild C2:** ChAT/GAD Doppelfärbung: Twitch und non-Twitch Motoneurone wie im Bild C1 mit ChAT/GAD Doppelfärbung. **Bild C2/I:** ChAT/GAD Doppelfärbung: non-Twitch Motoneuron wie im Bild C1/I im Detail von Bild C2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarze Pfeilspitze). **Bild C2/II:** ChAT/GAD Doppelfärbung: Twitch Motoneuron wie im Bild C1/II im Detail von Bild C2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarze Pfeilspitze).

3.4.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)

Die cholinergen Motoneurone verteilen sich gleichmäßig im Ncl. abducens und lassen sich anhand der ChAT/CSPG Doppelfärbung in zwei Gruppen einteilen (s. Kap. 3.3.1): Motoneurone mit perineuronalen Netze und Motoneurone ohne Netze. Auch einige Dendriten vornehmlich der netztragenden Motoneurone konnten identifiziert und ausgewertet werden. Beide Zellpopulationen zeigten ein gleichmäßiges Anfärbeverhalten auf GAD und waren in allen Ebenen aufzufinden.

Insgesamt konnten auf den analysierten histologischen Schnittebenen des Ncl. abducens 155 putative Twitch Motoneurone und 27 Dendriten vom Fall 1 und 59 putative Twitch Motoneurone und 7 Dendriten vom Fall 2 identifiziert werden. Die non-Twitch Motoneurone waren etwas spärlicher aufzufinden. Es konnten 71 non-Twitch Motoneurone und 15 Dendriten vom Fall 1 und nur 12 non-Twitch Motoneurone und keinen Dendrit vom Fall 2 identifiziert werden (Ergebnisse (Anzahl der GAD-haltigen Endigungen geteilt durch die gemessene Strecke) und statistische Wertes. Tab. 7).

3.4.2 Non-Twitch Motoneurone außerhalb des Kerns im medialen Randbereich

Es ließen sich auch Zellen, die non-Twitch Eigenschaften (cholinerge Neurone ohne PNN) aufwiesen und außerhalb des Kerns in der Nähe des MLF an der medialen Seite des Ncl. abducens lokalisiert waren, identifizieren. Diese Neurone könnten die putativen non-Twitch Neurone, die sowohl beim Rhesusaffen (Büttner-Ennever, 2006) und auch beim Menschen (Horng, 2011) den Ncl. abducens medial demarkieren. Diese Neurone zeigten kontroverse Färbeintensität, d.h. einige Neurone waren in der ChAT/GAD Doppelfärbung mit vielen braunen Pünktchen (s. Abb. 12-Bild B2/I), die anderen mit spärlichen braunen Pünktchen (GAD-haltigen Endigungen) (s. Abb. 12 - Bild B2/II) zu sehen. Außer der unterschiedlichen Färbeintensität zeigten diese Zellen verschiedene Zellformen. Die Zellen mit vielen braunen Pünktchen besaßen einen großen polygonalen Zellkörper (s. Abb. 12 -Bild B2/I), der für die putativen Twitch Motoneurone typisch wäre. Während die Zellen mit wenigen braunen Pünktchen ein kleines rundliches Zellsoma (s. Abb. 12 - Bild B2/II), typisch für Non-Twitch Motoneurone, aufwiesen. Die putativen non-Twitch Motoneurone im Kern repräsentierten ein deutlich einheitlicheres Bild der ChAT/GAD Doppelfärbung durch eine gleichmäßige Beladung des Zellkörpers mit braunen Pünktchen (s. Abb. 12 - Bild C2/I). Diese Beobachtung wurde nicht näher analysiert.

Insgesamt konnten auf den analysierten histologischen Schnittebenen des Ncl. abducens 45 putative non-Twitch Motoneurone und 10 Dendriten im Kern und 26 putative non-Twitch Motoneurone und 5 Dendriten außerhalb des Kerns aufgefunden werden (Ergebnisse (Anzahl der GAD-haltigen Endigungen geteilt durch die gemessene Strecke) und statistische Werte s. Tab. 8).

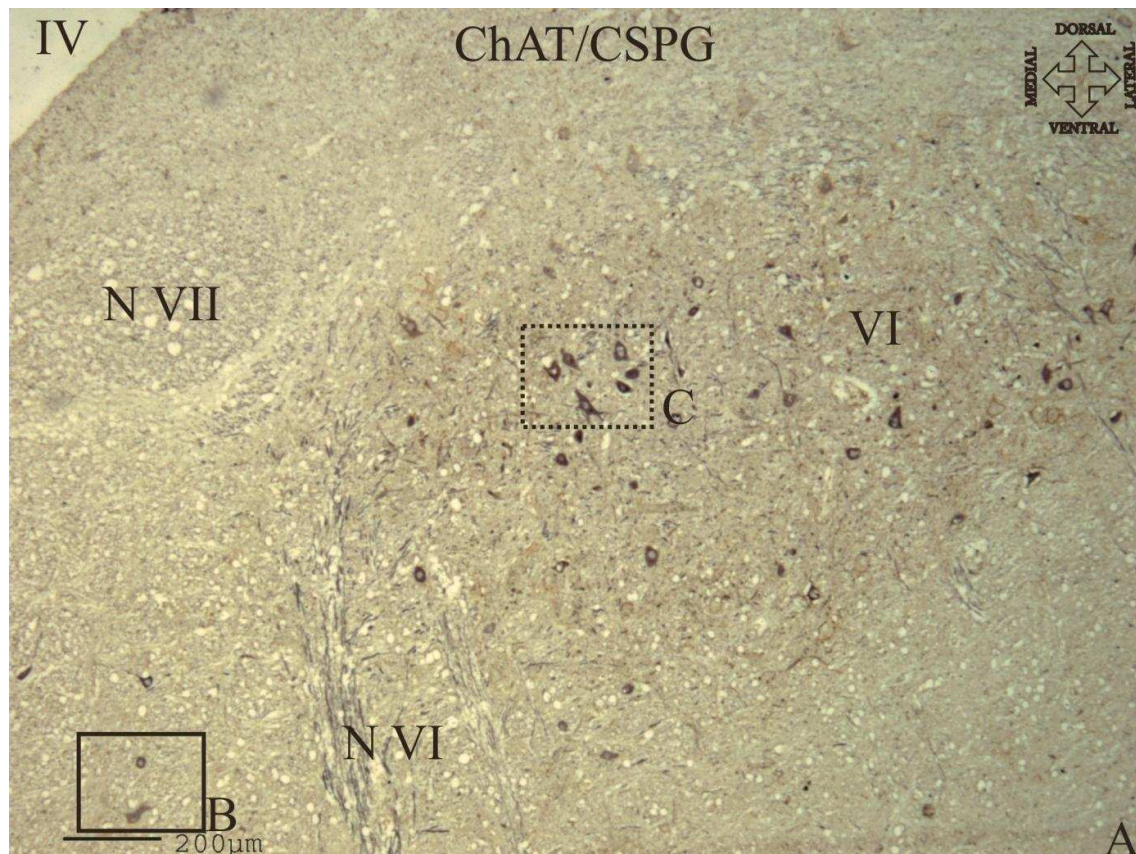


Abb. 12 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder GAD (braun)

Bild A: Übersichtsaufnahme von einem Transversalschnitt durch den rechten Ncl. abducens auf mittlerer Höhe (Fall 1), der auf ChAT (schwarz) und perineuronale Netze (braun) angefärbt wurde, für die Repräsentation der Lokalisation der Zellen (IV – IV.Ventrikel; N VII-Nervus facialis; VI-Nucleus abducens; N VI-Nervus abducens).

Bild B: Detailaufnahme markierten Areals B von Bild A. **Bild B1:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: zwei unterschiedliche putative non-Twitch Motoneurone (roter Pfeil), die im medialen Randbereich des Ncl. abducens liegen. **Bild B1/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: putatives cholinerges (weißer Stern) non-Twitch Motoneuron mit großem polygonalem Zellsoma, als Detail von Bild B1. **Bild B1/II:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: putatives cholinerges (weißer Stern) non-Twitch Motoneuron mit kleinem rundem Zellsoma, herausvergrößert von Bild B1. **Bild B2:** ChAT/GAD Doppelfärbung: putative non-Twitch Motoneurone wie im Bild B1, aber in ChAT/GAD Doppelfärbung. **Bild B2/I:** ChAT/GAD Doppelfärbung: putatives non-Twitch Motoneuron, wie im Bild B1/I mit ChAT/CSPG Doppelfärbung mit großem polygonalem Zellsoma, herausvergrößert vom Bild B2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarzer Pfeilspitze). **Bild B2/II:** ChAT/GAD Doppelfärbung: putatives non-Twitch Motoneuron wie im Bild B1/II in ChAT/CSPG Doppelfärbung mit kleinem rundlichem Zellsoma, als Detail von Bild B2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarzer Pfeilspitze).

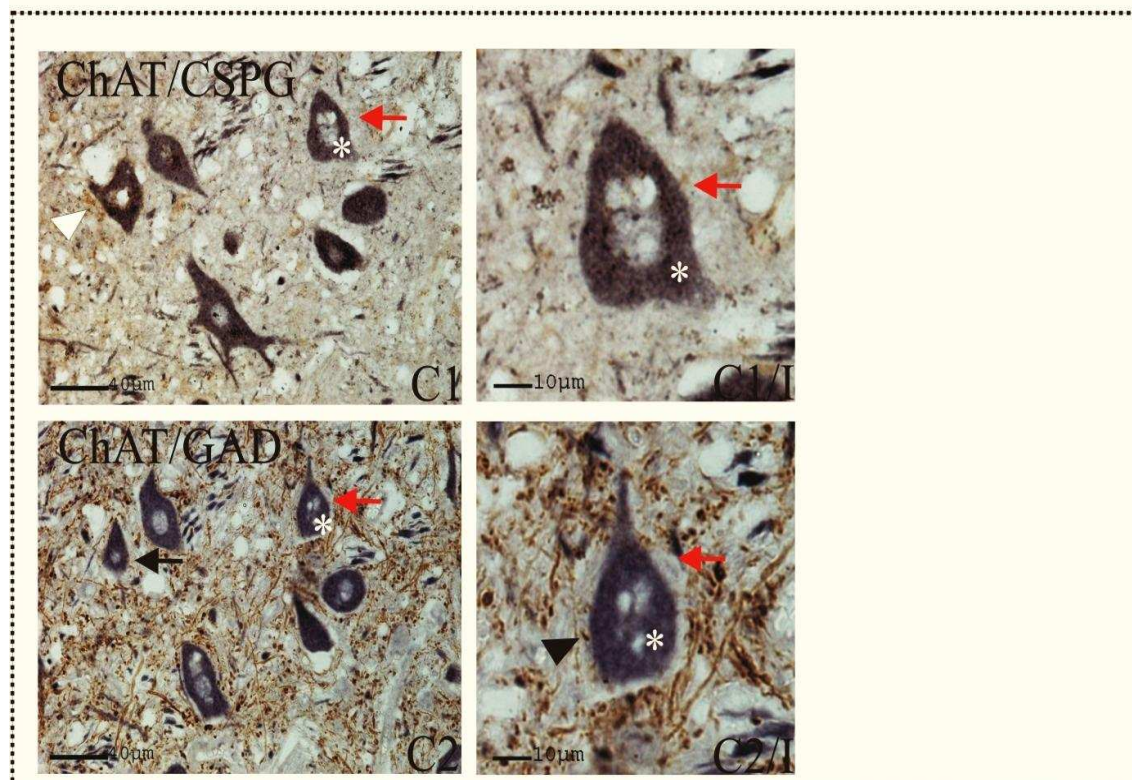
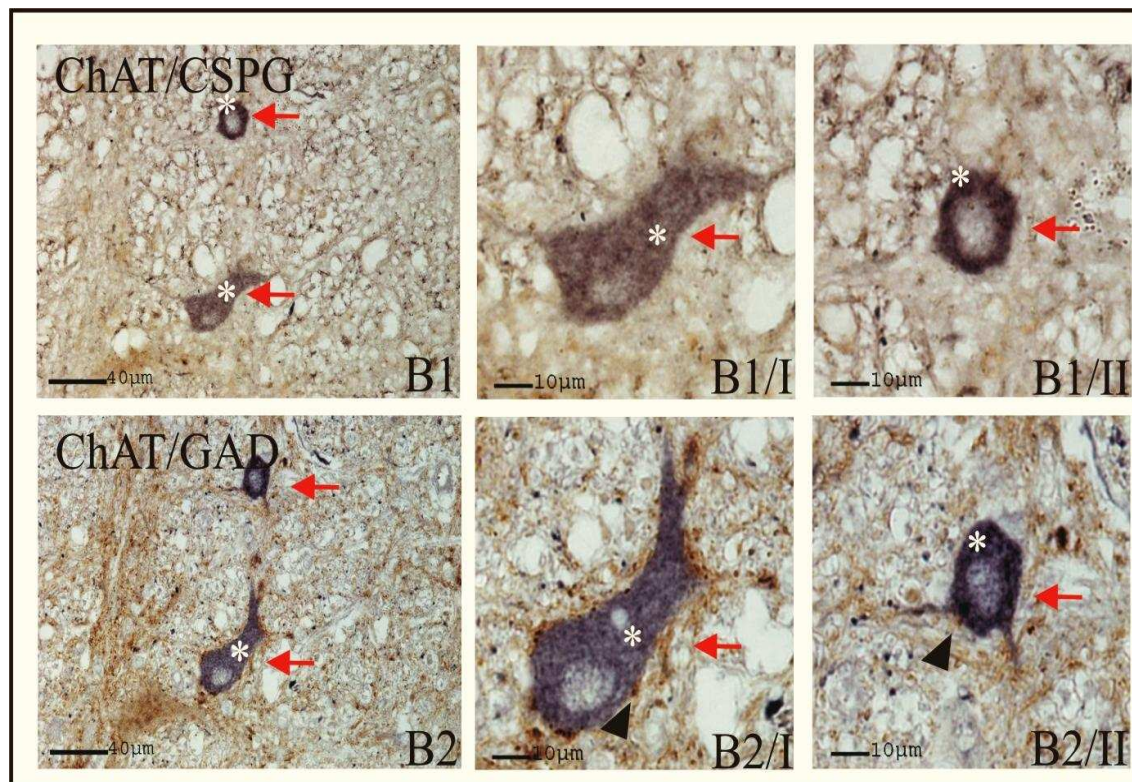


Bild C: Detailaufnahme markierten Areals C von Bild A. **Bild C1:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: putatives non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil) im Ncl. abducens. **Bild C1/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: putatives non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil) im Detail von Bild C1. **Bild C2:** ChAT/GAD Doppelfärbung: non-Twitch Motoneuron wie im Bild C1, aber in ChAT/GAD Doppelfärbung. **Bild C2/I:** ChAT/GAD Doppelfärbung: putatives non-Twitch Motoneuron wie im Bild C1/I mit ChAT/CSPG Doppelfärbung im Detail von Bild C2 mit Markierung der GAD-haltigen Endigungen (schwarze Pfeilspitze).

3.4.3 Internukleäre Neurone (III)

Durch die ChAT/CSPG Doppelfärbung ließen sich nicht-cholinerge Neurone mit intensivem braunem Netz markieren und die vermutlichen internukleären Neurone darstellen. Diese Zellen waren in allen Schnittebenen vorhanden, besonders in der mittleren Ebene. Die Dendriten dieser nicht-cholinergen Neurone konnte man schlecht identifizieren.

Insgesamt konnten auf den analysierten histologischen Schnittebenen des Ncl. abducens 45 putative internukleäre Neurone vom Fall 1 und 8 putative internukleäre Neurone vom Fall 2 identifiziert werden. Leider konnte nur jeweils ein Dendrit aufgefunden werden (Ergebnisse (Anzahl der GAD-haltigen Endigungen geteilt durch die gemessene Strecke) und statistische Wertes.Tab. 7).

3.4.4 Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone (IV)

Im Rahmen dieses Projektes wurden die PMT-Neurone von den internukleären Neurone nicht abgegrenzt und näher untersucht (s. Kap. 3.3.3).

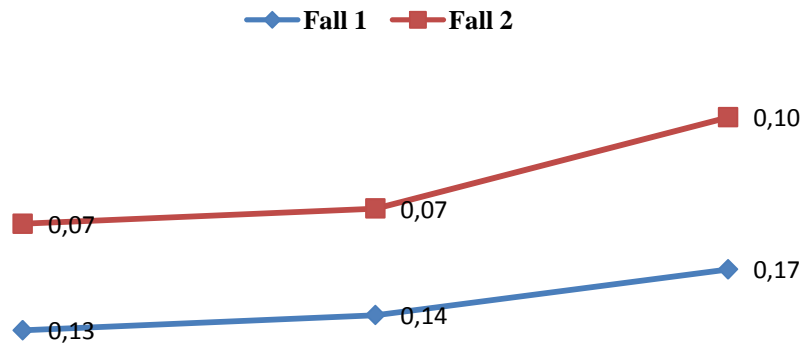
3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellpopulationen (ChAT/GAD)

		Twitch Motoneurone		non-Twitch Motoneurone		internukleäre Neurone	
		Zellkörper	Dendriten	Zellkörper	Dendriten	Zellkörper	Dendriten
Fall 1 insgesamt 271 Zellen	Zellzahl / Prozentzahl	155 / 57%	27	71 / 26%	15	45 / 17%	1 !
	Mittelwert der Ergebnisse*	0,13	0,16	0,14	0,16	0,17	0,39 !
	Standard-abweichung der Ergebnisse*	0,05	0,05	0,07	0,05	0,06	0!
Fall 2 insgesamt 79 Zellen	Zellzahl / Prozentzahl	59 / 75%	7	12 / 15%	0!	8 / 10%	1!
	Mittelwert der Ergebnisse*	0,07	0,06	0,07	0!	0,10	0,10!
	Standard-abweichung der Ergebnisse*	0,06	0,01	0,04	-!	0,04	0!
Fall 1 + Fall 2	Neuronen- / Dendriten- anzahl gesamt (Fall 1+Fall 2) 350 und Prozentzahl	214 / 62%	34	83 / 23%	15	53 / 15%	1!
ChAT Positivität vs. ChAT Negativität		85%				15%	

Tab. 7 - Zusammenfassung der Ergebnisse der ChAT/ GAD Doppelfärbung

* Anzahl der gezählten GAD-haltigen Endigungen / gemessene Strecke der Zellgrenze

! Bemerkung – Wegen niedriger Fallzahlen müssen diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden



Twitch Motoneurone

non-Twitch Motoneurone

internukleäre Neurone

Diagr. 2 - Mittelwerte der Ergebnisse (ChAT / GAD)

(Anzahl der GAD-haltigen Endigungen / gemessene Strecke der Zellgrenze)

! Bemerkung: Die Dendriten wurden wegen der niedrigen Fallzahl nicht erfasst

Fall 1	non-Twitch Motoneurone			
			Zellkörper	Dendriten
	Zellen im Ncl. abducens	Zellzahl	45	10
		Mittelwert der Ergebnisse*	0,16	0,16
		Standardabweichung der Ergebnisse *	0,07	0,06
	Zellen im medialen Randbereich außerhalb des Ncl. abducens	Zellzahl	26	5
		Mittelwert der Ergebnisse*	0,10	0,15
		Standardabweichung der Ergebnisse *	0,05	0,04

Tab. 8 - Unterschiede der GAD-haltigen Endigungen der non-Twitch Motoneurone

(im Kern vs. außerhalb des Kerns)

* Anzahl der gezählten GAD-Endigungen/ gemessene Strecke der Zellgrenze

3.5 Glycinrezeptor Alpha 1 (GlycR α 1)-Färbung im Nucleus abducens

Die Darstellung der Glycinrezeptoren durch diesen Antikörper funktionierte relativ schwach, dadurch musste man auf eine ChAT/GlycR α 1 Doppelfärbung verzichten, da die sehr intensive ChAT-Färbung die braun markierten Glycinrezeptoren verdeckt. Als Lösung wurden die Strukturen durch eine Einfachfärbung mit GlycR α 1-Antikörper angefärbt, in der die Verdünnung reduziert und die DAB-Reaktion mit Ammonium-Nickelsulfate intensiviert wurde. Die vorher genannte Färbemethode funktionierte leider nur beim Fall 1. Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieses Projektes nur die Färbungen vom Fall 1 als Hauptfall analysiert und mit keinen Kontrollfärbungen vom Fall 2 verglichen. Nach der Einteilung und Identifizierung der Zellen erfolgte die Bestimmung der GlycR α 1-Positivität der unterschiedlichen Zellpopulationen. In diesem Fall konnten nicht so hohe Fallzahlen wie im Rahmen des anderen Projektes(ChAT/GAD) untersucht werden, da einige Färbungen mit den neuen Antikörper von Synaptic Systems auch nicht erfolgreich waren und die Anzahl der Präparate begrenzt war. Die Präparate stammten aus drei transversalen Schnittebenen des Ncl.abducens (caudale, mittlere und rostrale Ebene). Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop war ein uneinheitliches Färbeverhalten der Zellpopulationen zu sehen. Es zeigte sich sogar innerhalb einer Zellpopulation eine gewisse Inhomogenität, d.h. einige Zellen der gleichen Neuronengruppen waren stärker, die andere schwächer angefärbt. Bei der weiteren Analyse wurden die Zellen in zwei Gruppen (Glycin positive Zellen vs. Glycin negativ Zellen) einsortiert, die Färbeintensität und Rezeptorendichte wurde nicht erfasst. Trotz unterschiedlicher Färbeintensität, konnte man sehen, dass alle Zelltypen(Twitch Motoneurone; non-Twitch Motoneurone; internukleäre Neuronene) Glycin-Transmittereingänge erhielten (s. Tab. 9; Diagr. 3 und Abb. 13; 14). Aber es wurden auch gleiche Neuronentypen gefunden, die keine Glycin-Transmittereingänge besaßen. Die Dendriten wurden in diesem Projekt nicht analysiert, da erfahrungsgemäß durch die GAD-Färbungen die Dendriten der nicht ChAT positiven Neurone schlecht identifiziert werden konnten.

Die Gesamtanzahl der Neuronen der analysierten Schnitten beträgt 124. Davon können 83 als Twitch Motoneurone, 22 als non-Twitch Motoneurone und 19 als internukleäre Neurone klassifiziert werden.

3.5.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)

Nach der Identifizierung erfolgte die Auswertung.

Insgesamt konnten auf den analysierten histologischen Schnittebenen des Ncl. abducens vom Fall 1 83 putative Twitch Motoneurone (s. Abb. 13 - Bild B1/I) aufgefunden werden, davon waren 43 (51,8%) Neurone durch Glycin-Färbung markiert (s. Abb. 13 - Bild B2/I) und 40 (48,2%) Neurone waren nicht markiert. Es konnten 22 non-Twitch Motoneurone dargestellt werden (s. Abb. 14 - Bild B1/I), davon waren 7 (31,8%) Neurone durch die Glycin-Färbung markiert (s. Abb. 14 - Bild B2/I) und 15 (68,2%) Neurone waren nicht markiert (s. Tab. 9).

3.5.2 Internukleäre Neurone (III)

Insgesamt konnten auf den analysierten histologischen Schnittebenen des Ncl. abducens 19 putative internukleäre Neurone identifiziert werden (s. Abb. 13 - Bild B1/II), davon waren 8 (42,1%) Neurone durch die Glycin-Färbung markiert (s. Abb. 13 - Bild B2/II) und 11 (57,9%) Neurone waren nicht markiert (s. Tab. 9).

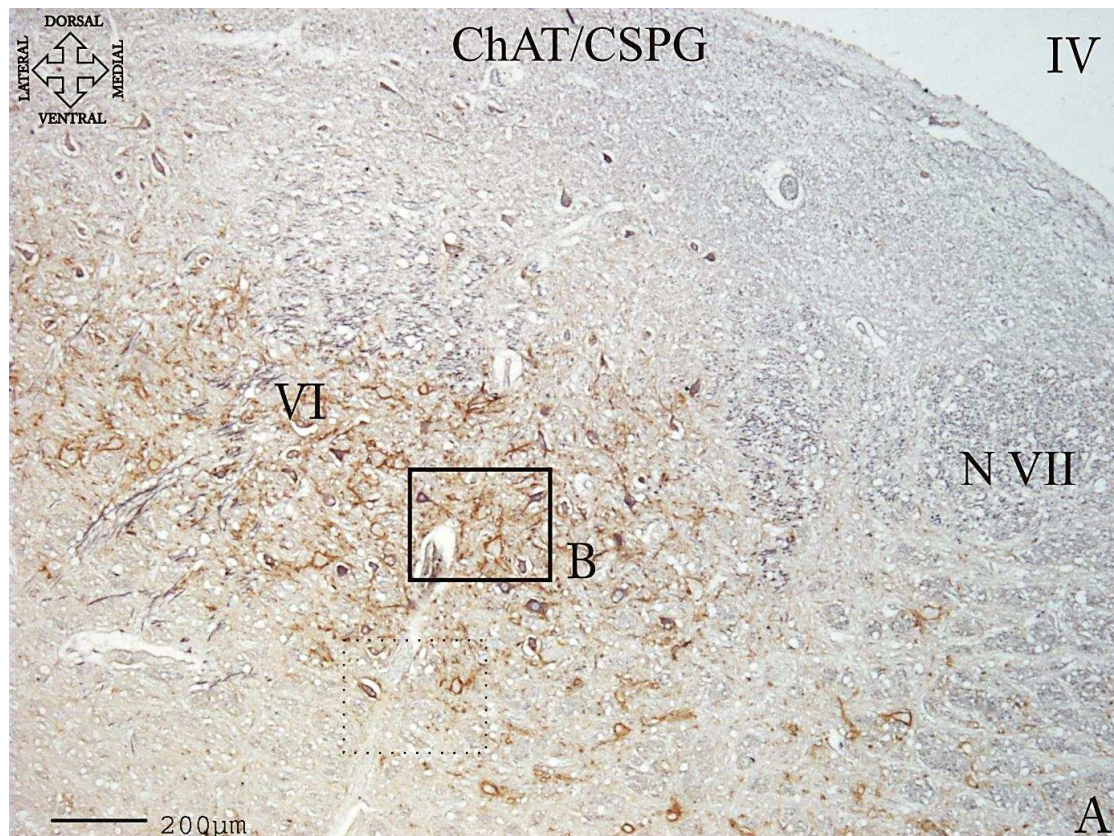


Abb. 13 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder GlycRa1 (schwarz)

Bild A: Übersichtsaufnahme eines Transversalschnitts durch den linken Ncl. abducens in der rostralen Ebene vom Fall 1 in ChAT/CSPG Doppelfärbung, für die Repräsentation der Lokalisation der Zellen (IV – IV. Ventrikel; N VII-Nervus facialis; VI-Nucleus abducens).

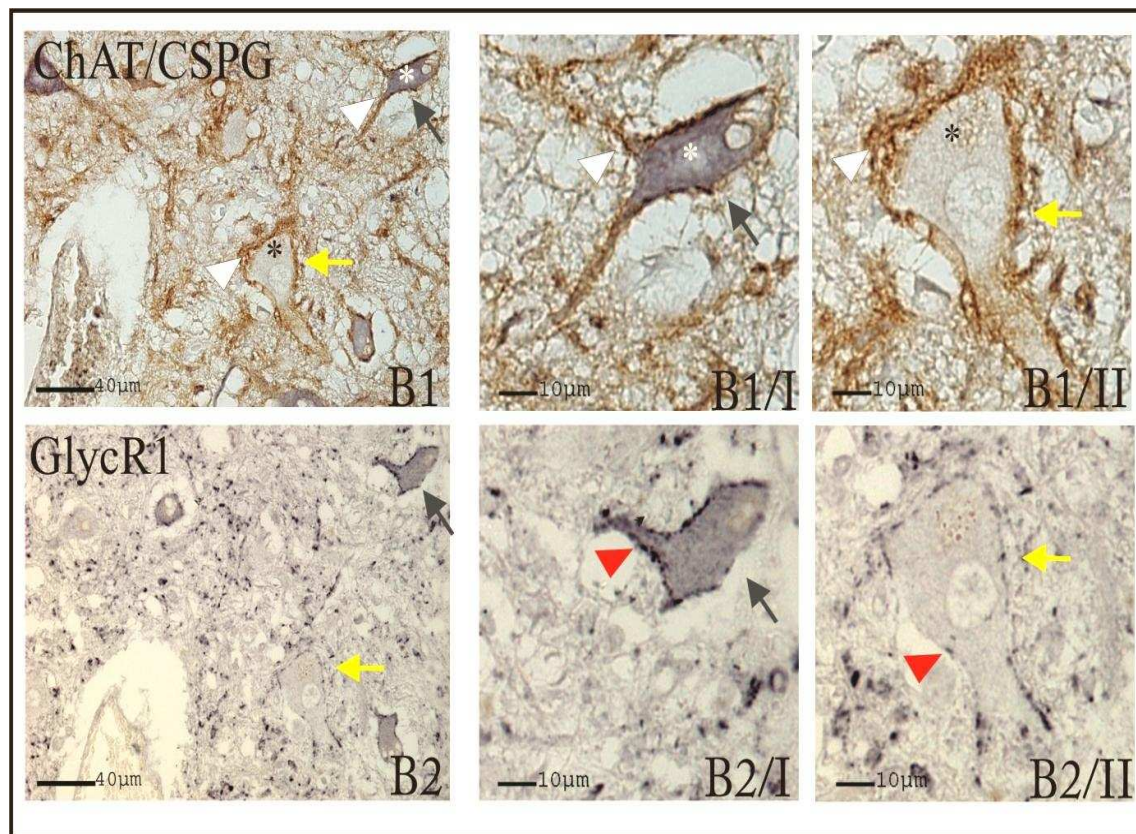


Bild B: Detailaufnahme des markierten Areals B von Bild A. **Bild B1:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: putatives Twitch Motoneuron (schwarzer Pfeil) und ein putatives internukläres Neuron (gelber Pfeil). **Bild B1/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: cholinerges (weißer Stern) Twitch Motoneuron mit perineuronalen Netze (weiße Pfeilspitze) als Detail von Bild B1. **Bild B1/II:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: nicht-cholinerges (schwarzer Stern) internukläres Neuron (gelber Pfeil) mit perineuronalen Netze (weiße Pfeilspitze) als Detail von Bild B1. **Bild B2:** GlycR α 1 Einfachfärbung: Twitch Motoneuron und internukläres Neuron, wie im Bild B1 mit ChAT/CSPG Doppelfärbung. **Bild B2/I:** GlycR α 1 Einfachfärbung: Twitch Motoneuron wie im Bild B1/I mit ChAT/CSPG Doppelfärbung als Detail von Bild B2 mit Markierung der Glycinrezeptoren (rote Pfeilspitze). **Bild B2/II:** GlycR α 1 Einfachfärbung: internukläres Neuron wie im Bild B1/II mit ChAT/CSPG Doppelfärbung mit Markierung der Glycinrezeptoren (rote Pfeilspitze) als Detail von Bild B2.

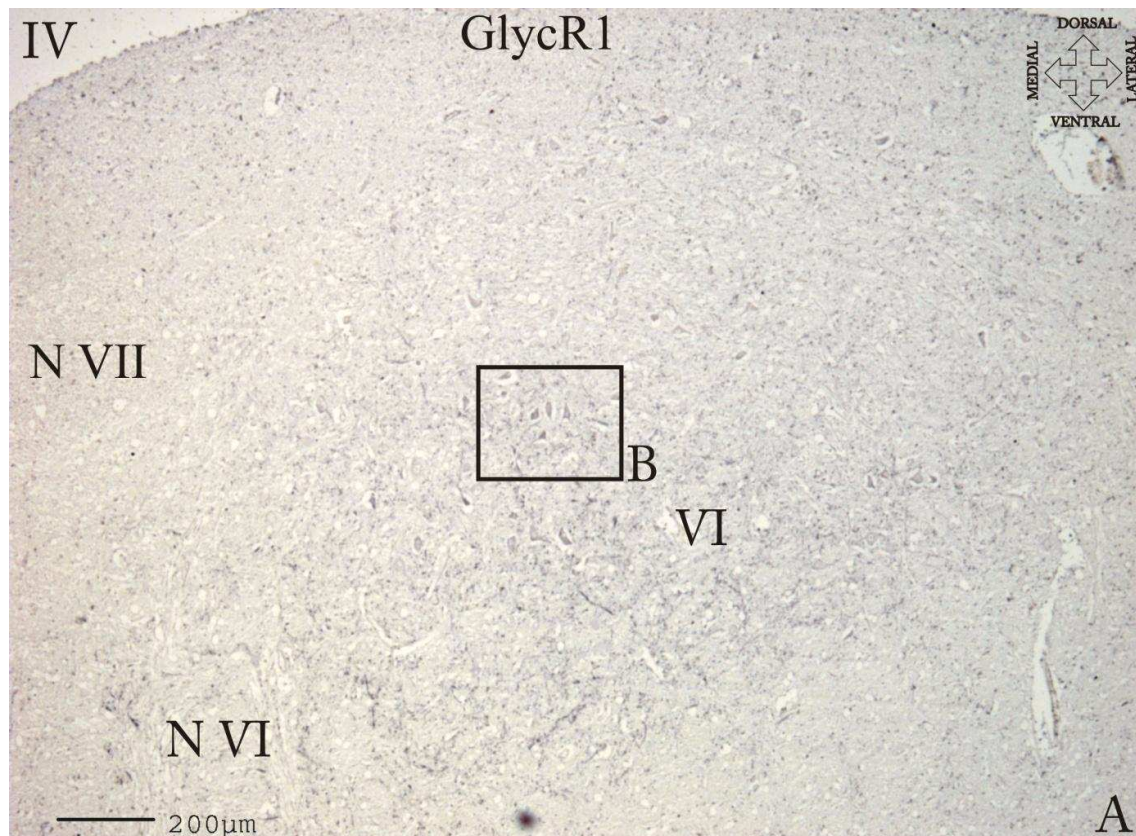


Abb. 14 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder GlycR α 1 (schwarz)

Bild A: Übersichtsaufnahme eines Transversalschnitts durch den rechten Ncl. abducens in der mittleren Ebene von Fall 1, gefärbt auf GlycR1, für die Repräsentation der Lokalisation der Zellen. Der Nachbarschnitt in ChAT/CSPG Doppelfärbung ist in Abb. 12 gezeigt (IV – IV.Ventrikel; N VII-Nervus facialis; VI-Nucleus abducens; N VI- Nervus abducens).

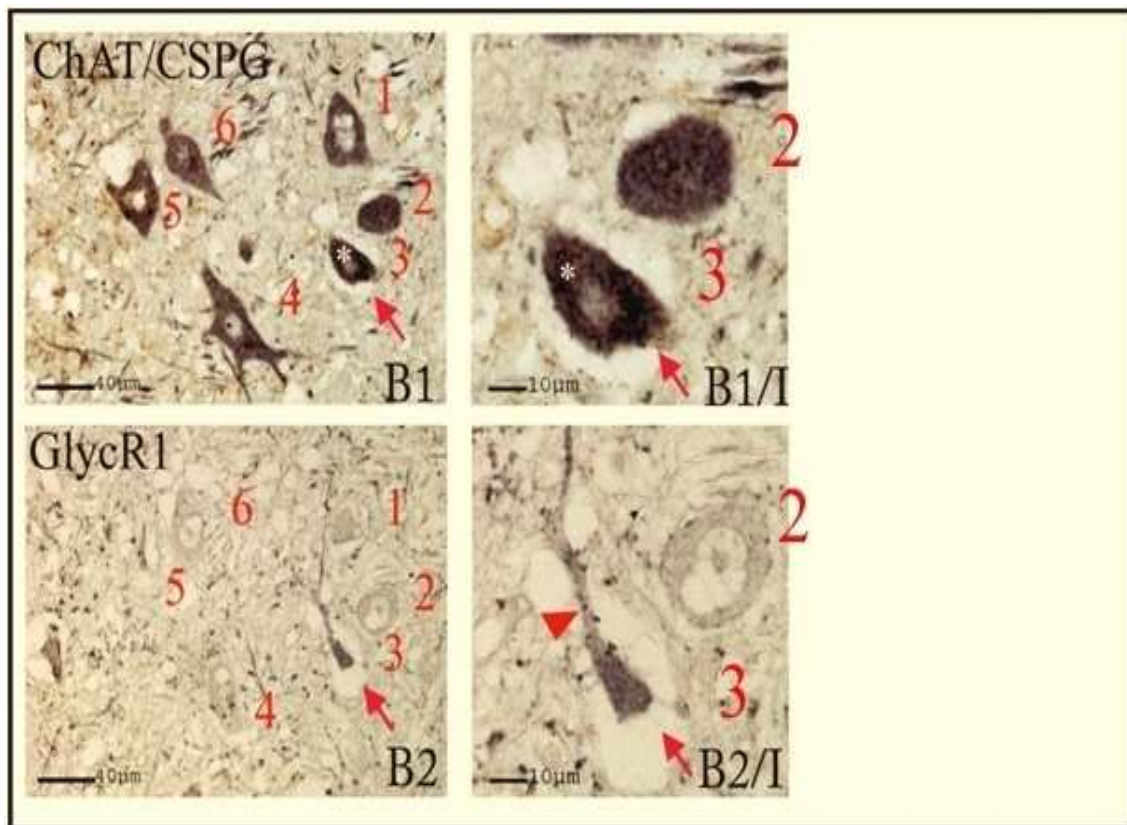
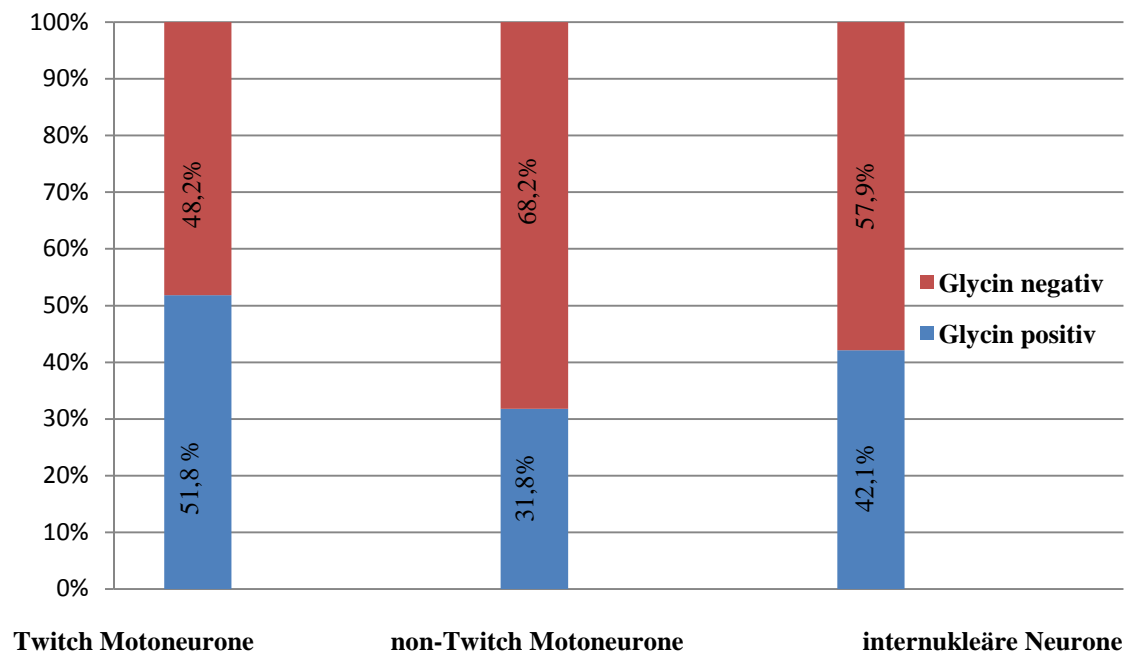


Bild B: Detailaufnahme des markierten Areals B von Bild A. **Bild B1:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: putatives non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil; ZellNr. 3) **Bild B1/I:** ChAT/CSPG Doppelfärbung: cholinerges (weißer Stern) non-Twitch Motoneuron ohne perineuronale Netze, herausvergrößert vom Bild B1. **Bild B2:** GlycR α 1 Einfachfärbung: non-Twitch Motoneuron (roter Pfeil; ZellNr. 3) von Bild B1 **Bild B2/I:** GlycR α 1 Einfachfärbung: non-Twitch Motoneuron, wie im Bild B1/I mit ChAT/CSPG Doppelfärbung, Im Detail von Bild B2 mit Markierung der Glycinrezeptoren (rote Pfeilspitze).

3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellpopulationen (GlycinRa1)

Fall 1		Twitch Motoneurone		non-Twitch Motoneurone		internukleäre Neurone	
		Zellzahl	%	Zellzahl	%	Zellzahl	%
	Glycin positiv	43	51,8%	7	31,8%	8	42,1%
	Glycin negativ	40	48,2%	15	68,2%	11	57,9%
	Neuronenzahl gesamt / Prozentzahl	83 / 67%		22 / 18%		19 / 15%	
	ChAT positivität vs. ChAT negativität	105 / 85 %				19 / 15%	
	gesamte Neuronenzahl	124					

Tab. 9 – Zusammenfassung der Ergebnisse der GlycinRa1 Einfärbung



Diagr. 3 - Prozentuale Verteilung der Glycinpositiven vs. Glycin negativen Neurone

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die glycinergen und γ -Aminobuttersäure-(GABA)ergen inhibitorischen Transmittereinträge auf funktionelle Neuronengruppen im Nucleus abducens des Menschen untersucht. Mithilfe einer Doppelfärbung auf Cholinacetyltransferase (ChAT) und Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG) wurden die funktionellen Neuronengruppen (Twitch, non-Twitch Motoneurone und internukleäre Neurone) voneinander unterschieden und auf ihre Färbereigenschaften mit Glutamatdecarboxylase (GAD) und Glycinrezeptor Alpha 1 (GlycR α 1) untersucht. Der erste Befund war, dass der menschliche Nucleus abducens einen gleichermaßen starken Input von GABA und Glycin erhält. Die Analyse der funktionellen Neuronengruppen zeigte, dass alle Neuronengruppen sowohl durch GAD- als auch GlycR α 1-Anfärbung markiert wurden. Es konnten aber durch die quantitative und qualitative Untersuchungen keine großen Unterschiede der Transmittereinträge in Bezug auf Twitch, non-Twitch und internukleäre Neurone festgestellt werden.

4.1 Identifizierung funktioneller Neuronengruppen im Nucleus abducens

4.1.1 Twitch und non-Twitch Motoneurone (I;II)

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Abgrenzung der funktionellen Neuronengruppen im Nucleus abducens kombinierte Immunfärbungen auf ChAT und perineuronale Netze (CSPG) durchgeführt, deren gemeinsames Auftreten putative „Twitch Motoneurone“ markiert. Am Rhesusaffen und an der Ratte konnte durch kombinierten Tracerinjektionen in die äußeren Augenmuskeln gezeigt werden, dass nur die Twitch Motoneuronen innerhalb der Motokerne, die nach einer Injektion in den Muskelbauch retrograd markiert werden, perineuronale Netze tragen, nicht aber die peripher gelegenen non-Twitch Motoneurone, die sich nur über eine Tracerinjektion in den Muskelsehnenübergang anfärben lassen (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005, Eberhorn et al., 2006). Als perineuronale Netze wird die gitterähnliche extrazelluläre Matrix bezeichnet, welche hauptsächlich die Somata und proximalen Dendriten umgibt. Chemisch bestehen sie aus Glykoproteinen, Hyaluronsäure, Proteoglykanen und vor allem aus dem Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG), gegen das der hier eingesetzte Antikörper gerichtet war (Bertolotto et al., 1996; Brückner et al., 1994; DeYoe et al., 1990; Seeger et al., 1994; Brauer et al., 1982; Celio and Blümcke, 1994; Celio et al., 1998). Die genaue Funktion dieser Netze ist noch unklar, aber es wird eine häufige Assoziation mit Neurone gefunden, die das Calcium-bindende Protein Parvalbumin enthalten (Brückner et al., 1994; Härtig et al., 1994; Horn et al.,

2003). Dieses Protein wiederum findet sich meist in Neurone mit hoher metabolischer Aktivität, die lang andauernd oder hochfrequent feuern (Baimbridge et al., 1992; Blümcke and Celio, 1992; Brückner et al., 1993). Das deckt sich mit den hohen Feuerungsraten von Twitch Motoneurone, die in Einzelfällen sogar bis zu 800 Hz erreichen können (Robinson, 1970; Fuchs und Luschei, 1971; Fuchs et al., 1988). Im Unterschied zu den cholinergen Twitch Motoneurone weisen im Tierexperiment die multipel-innervierten non-Twitch Motoneurone keine perineuronalen Netze auf (Eberhorn et al., 2005; 2006). Auf diese Weise konnten beim Menschen putative non-Twitch Motoneurone im Nucleus oculomotorius und Nucleus abducens identifiziert werden (Horn et al., 2008; Horng, 2011). Ähnlich wie beim Rhesusaffen fanden sich im menschlichen Nucleus oculomotorius die putativen Motoneuronen eher in der Peripherie dorsomedial, medial und ventromedial zum Kern allerdings nicht in so kompakten Gruppen (Horn et al., 2008). Im Nucleus abducens bilden beide Motoneuronengruppen keine so klar getrennte räumliche Lokalisation. Eine große Gruppe netzloser cholinerges Neurone (non-Twitch Motoneurone) fand sich in der Peripherie medial zum Nucleus abducens, aber ähnlich wie beim Affen liegen zahlreiche putative non-Twitch Motoneurone auch innerhalb des Kerns (Eberhorn et al., 2005; Horng, 2011), was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Der Großteil der Neurone im Nucleus abducens ca. 83-90% (GAD-Projekt: Fall 1 – 83%; Fall 2 – 90 %; GlycR α 1-Projekt: Fall 1 – 85 %/ s. Tab 7; 9/) reagiert positiv auf ChAT-Färbung und somit können sie als putative Motoneurone klassifiziert werden. In der Arbeit von (Horng, 2011) konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Rhesusaffen die Zahl der non-Twitch Motoneurone beim Menschen etwa doppelt so groß ist (Rhesusaffe ca. 10 %, Mensch ca. 22%), was die kleine Zahl der aufgefundenen putativen non-Twitch Motoneuronen ca. 15-26% (GAD-Projekt: Fall 1 – 26 %; Fall 2 – 15%; GlycR α 1-Projekt: Fall 1 - 18%/ s. Tab 7; 9/) erklären würde. In der Literatur wurden allerdings auch beim Rhesusaffen ein prozentualer Anteil von 20% beschrieben (Eberhorn et al., 2005).

4.1.2 Internukleäre Neurone (III)

Die internukleären Neurone im Nucleus abducens sind nicht cholinerg, sondern die benutzen Glutamat und/oder Aspartat als Transmitter (Carpenter et al., 1992; Spencer and Baker, 1986). Infolgedessen lassen sie sich in der ChAT-Färbung gut von den cholinergen Motoneurone unterscheiden (Eberhorn et al., 2005). Elektrophysiologische Untersuchungen am Affen haben gezeigt, dass die internukleären Neurone eine ähnlich hohe Feuerungsrate besitzen wie die Motoneurone (Fuchs et al. 1988). Deshalb ist es nicht überraschend, dass die putativen internukleären Neurone auch perineuronale Netze besitzen (Eberhorn et al., 2005; Horng, 2011), was an der Ratte mit kombinierten Tracerinjektionen in den Nucleus oculomotorius ebenfalls gezeigt werden konnte (Eberhorn et al., 2006). Wie in den Untersuchungen von Horng (2011) konnte auch in vorliegender Arbeit keine klare räumliche Trennung der Motoneurone zu den internukleären Neurone gefunden werden. Im Unterschied zur Katze, wo ein gewisses Verteilungsmuster der internukleären Neurone innerhalb des Kerns beschrieben wurde (Steiger and Büttner-Ennever, 1978), scheinen beide Populationen (Motoneurone und internukleäre Neurone) beim Menschen miteinander vermischt zu liegen. Eine Tendenz zu einer bevorzugten Lokalisation internukleärer Neurone in den ventralen zwei Dritteln des Nucleus abducens (Horng, 2011) konnte in diesem Projekt nicht bestätigt werden. Unklar ist die hier gefundene geringe Anzahl von putativen internukleären Neurone, die ca. 10%-17% (GAD-Projekt: Fall 1 - 17%; Fall 2 – 10% Gesamt: 15%; GlycR α 1-Projekt: Fall 1 - 15%/ s. Tab 7; 9/) der Gesamtneuronenpopulation ausmachten im Vergleich zu 27-47% putativer internukleärer Neurone in einer früheren Untersuchung (Horng, 2011). Ein möglicher Grund ist die Benutzung eines anderen CSPG-Antikörpers, der zur Markierung der perineuronalen Netze der internukleären Neuronen eingesetzt werden musste, nachdem der ursprüngliche Antikörper nicht mehr gekauft werden konnte. Dieser neue Antikörper hat vergleichsweise evtl. zu schwächeren Anfärbungen erzielt und damit zur ungewollten Unterschätzung der CSPG-positiven internukleären Neuronen geführt.

4.1.3 Paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone (IV)

Eine weitere funktionelle Neuronengruppe im Nucleus abducens, die die gleichen Färbereigenschaften wie die internukleären Neurone aufweist, – nicht-cholinerg, aber CSPG-positiv – bildet die paramedian-Trakt (PMT)-Gruppen-Neurone. Diese Neurone liegen in den paramedianen Trakten im Hirnstamm in bisher sechs identifizierten Gruppen beidseits der Mittellinie. Beim Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass diese Neurone von allen Regionen, die den Augenmuskelkernen vorgeschaltet sind, Eingänge erhalten und dass sie zum Flocculus des Kleinhirns projizieren (Büttner-Ennever and Büttner, 1988; Büttner-Ennever et al., 1989; Büttner and Büttner-Ennever, 2006; Büttner-Ennever, 1992; Langer et al., 1985; Nakamagoe et al., 2000). Kürzlich wurde auch ein erster Versuch unternommen, um diese Neuronen im menschlichen Hirnstamm zu identifizieren (Buresch, 2005). Eine der sechs PMT-Zellgruppen bildet eine „Kappe“ am rostralen Ende des Nucleus abducens (s. Abb. 5- Bild A). Nachdem anhand histochemischer Eigenschaften keine eindeutige Unterscheidung zwischen den internukleären und PMT-Neurone möglich war, wurden die Untersuchungen nicht auf der Ebene des rostralen Endes vom Nucleus abducens durchgeführt und damit auf eine Untersuchung der PMT-Neurone verzichtet.

4.2 Inhibitorische Transmittereingänge auf Zellsomata der funktionellen Neuronengruppen im Nucleus abducens des Menschen

Im Rahmen dieser Arbeit versuchte man die Lokalisation des inhibitorischen Inputs in Hinsicht auf die Dendriten und Zellsomata zu identifizieren. Leider waren die Dendriten spärlich aufzufinden. Es konnten bei den Motoneurone 49 Dendriten und bei den internukleären Neuronen nur 2 Dendriten eindeutig aufgefunden werden. Die Identifikation der Dendriten von internukleären Neurone war stark erschwert, weil sie nicht durch einen positiven Marker (wie ChAT bei den Motoneurone) angefärbt werden konnten und dadurch im Neuropil untergingen. Aus diesem Grund wurde auf eine selektive Analyse der Glyzin-Eingänge auf die Dendriten verzichtet. Im Folgenden werden nur die inhibitorischen Trasmittereingänge auf Zellsomata der funktionellen Neuronengruppen des humanen Nucleus abducens diskutiert.

4.2.1 γ -Aminobuttersäure(GABA) im Nucleus abducens

4.2.1.1 Marker für Glutamatdecarboxylase(GAD)-haltige Endigungen

Glutamatdecarboxylase (GAD) ist das Enzym, das die Decarboxylierung von Glutamat zu dem inhibitorischen Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und CO₂katalysiert(Königshoff, 2004 a). Es gibt zwei Isoformen von GAD, die sich in Molekulargröße, Aminosäuresequenz und Lokalisation unterscheiden (Erlander et al., 1991). Es gibt zwei Rezeptoren für das Enzym: der ionotrope GABA_A-Rezeptor, der die Durchlässigkeit der Chloridkanäle steuert und wie die Glycinrezeptoren wirkt, und der metabotrope Adenylatcyklase gebundene GABA_B-Rezeptor, der die Kaliumkanäle reguliert und bei Aktivierung ebenfalls eine Hyperpolarisation der Zellen zur Folge hat (Karow, 2009 a). Die Konzentration von GABA im synaptischen Spalt wird durch verschiedene GABA-Transporter reguliert (Borden, 1996; Pabel et al., 2012; Kaufman, 2003 d). Gegen alle genannten Proteine gibt es Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörpern gegen GAD eingesetzt, die an menschlichen Paraffinschnitten gut funktionieren und vorzugsweise Nervenendigungen anfärben.

4.2.1.2 γ -Aminobuttersäure(GABA)erge Transmittereingänge

Im Unterschied zum Rhesusaffen wies der Nucleus abducens des Menschen starke GABAerge Eingänge auf, die sich bereits an den freischwimmenden Präparaten (Fall 3) in der Übersicht zeigten, wo sich der Kern anhand der GAD-Immunfärbung deutlich von seiner Umgebung abgrenzen ließ (s. Abb. 10 - Bild B/I; B/II; B/III). Bei der weiteren quantitativen und qualitativen Analyse zeigten die unterschiedlichen

Neuronenpopulationen im Nucleus abducens gleichermaßen starke GABAerge Eingänge (s. Abb. 11 - Bild B2; B2/I; B2/II; C2; C2/I; C2/II). Nachdem auch unerwartet ähnlich starke GABAerge Eingänge auf die Motoneurone des M. rectus medialis im Nucleus oculomotorius nachgewiesen worden waren (Horn et al., 2009), konnte anhand der vorliegenden Befunde das Konzept am Menschen nicht bestätigt werden, dass GABA nur der inhibitorische Transmitter zur Vermittlung vertikaler Augenbewegungen ist (Spencer and Baker, 1992; Spencer et al., 1992). Es wurden zwar auch beim Affen und bei Katzen GABAerge Eingänge auf den Nucleus abducens beschrieben, aber in weitaus geringerem Maße (Spencer et al., 1992). Bei anderen Spezies, wie Katze und Hase, wurden hingegen keine großen Unterschiede der GABAergen Eingänge auf verschiedene Motoneuronengruppen gefunden (Wentzel et al., 1996; de la Cruz et al., 1992).

4.2.1.3 Quellen γ -Aminobuttersäure(GABA)erger Transmittereingänge auf den Nucleus abducens

Als mögliche Quellen GABAerger Eingänge zum Nucleus abducens dienen internukleäre Verbindungen vom Nucleus oculomotorius zum Nucleus abducens, was in kombinierten Trakt-Tracer und immunocytochemischen Färbungen an der Katze gezeigt wurde (de la Cruz et al., 1992). Diese GABAerge Eingänge wurden aber bevorzugt auf den Motoneurone nachgewiesen und nicht auf den internukleären Neurone (de la Cruz et al., 1992). Diese hemmenden Verbindungen spielen möglicherweise eine Rolle bei Vergenzbewegungen, bei denen die Motoneurone der beiden M. rectus medialis von bisher unbekannten Quellen aktiviert werden, und gleichzeitig die Motoneurone des Nucleus abducens gehemmt werden müssen (Mays and Porter, 1984). Dazu passt, dass die meisten Motoneurone und internukleären Neurone im Nucleus abducens eine verminderte Aktivität bei Konvergenzbewegungen der Augen zeigen (Gamlin et al., 1989). Als weitere mögliche Quellen für GABAerge Eingänge sind die Vestibulariskerne oder der Nucleus præpositus hypoglossi (PrH) denkbar, was aber noch zu untersuchen wäre.

4.2.2 Glycin im Nucleus abducens

4.2.2.1 Marker für Glycinrezeptor Alpha 1 (GlycRa1)

Der inhibitorische Transmitter Glycin findet sich v.a. auf Rückenmarks- bzw. Hirnstammebene und in der Retina (Huppelsberg, 2005; Kaufman, 2003 c). Der Neurotransmitter bindet an einen Glycinrezeptor, der aus einem Proteinkomplex mit 4

α - und einer einzigen β -Untereinheit besteht und in der Zellmembran lokalisiert ist (Kuhse et al., 1993). Dieser Proteinkomplex kommt hauptsächlich in Nervenzellen, aber auch in anderen Zellen vor. Der Glycinrezeptor fungiert als ein Ionenkanal, der die Durchlässigkeit der Zellmembran für Chlorid-Ionen reguliert. Die Rezeptoren sitzen postsynaptisch und vermindern nach der Aktivierung durch Glycin dort die Zellerregbarkeit durch den Einstrom von Chlorid-Ionen, was eine Hyperpolarisation der nachgeschalteten Zelle zur Folge hat (Karow, 2009 a). Der Transmitter kann aber auch als Coagonist am ionotropen N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptor, einem Subtyp des Glutamaterezeptors wirken (Hansen et al., 2012). Dadurch ist Glycin sowohl bei inhibitorischen als auch bei excitatorischen Gehirnprozessen involviert und spielt z.B. auch bei Schlafprozessen eine wichtige Rolle (Bannai and Kawai, 2012). Die glycinergen Eingänge wurden in der vorliegenden Arbeit über die immunocytochemischen Färbungen des Glycinrezeptors $\alpha 1$ dargestellt, der erwartungsgemäß eher die postsynaptische Membran anfärbte.

4.2.2.2 Glycinerge Transmittereingänge

Ähnlich der Befunde an der Katze und beim Rhesusaffen konnte jetzt erstmals am Nucleus abducens des Menschen ein starker glycinerger Input gezeigt werden, der sich bereits an den freischwimmenden Präparaten (Fall 3) in der Übersicht demonstrieren ließen (Spencer et al., 1992; Spencer et al., 1989) (s. Abb. 10 – Bild D/I; D/II; D/III). Bei der weiteren qualitativen Analyse vom Fall 1 konnten bei allen Neuronenpopulationen im Nucleus abducens Glycin positive Neurone identifiziert werden (Abb. 13 – Bild B2; B2/I; B2/ II; Abb. 14 – B2; B2/I). Nachdem beim Rhesusaffen auch die Motoneurone des M. rectus medialis einen selektiven glycinergen Eingang erhalten, wurde von Spencer und Kollegen das Konzept vertreten, dass die Inhibition der Motoneurone für horizontale Augenbewegungen über Glycin erfolgt. Mit vorläufigen Befunden aus einer anderen Untersuchung in der Arbeitsgruppe, die zeigten, dass die putativen Motoneurone des M. rectus medialis selektiv mit Glycin-Markern assoziiert sind (Horn, eigene Beobachtungen), bestätigt sich das von Spencer et al. vorgeschlagene Konzept mit Glycin als inhibitorischen Transmitter für horizontale Augenbewegungen auch für den Menschen.

4.2.2.3 Quellen glycinerger Transmittereingänge auf den Nucleus abducens

Mit kombinierten physiologischen, Trakt-Tracer und immunocytochemischen Methoden wurde es an der Katze gezeigt, dass die glycinergen Eingängen von hauptsächlich drei Quellen stammen: dem ipsilateralen Nucleus vestibularis medialis (MVN), dem

Abb. 15 - Schematische Darstellung der vestibulo-okulären Reflexbahnen bei horizontaler Kopfdrehung

Die glycinergen Eingänge auf den Nucleus abducens aktivieren gleichermaßen die Motoneurone wie auch die internukleären Neurone, wie kombinierte Ableitversuche an der Katze mit pharmakologischen Blockierungen des Glycinrezeptors mit Strychnin, zeigten (Spencer et al., 1989). Der Nucleus paragigantocellularis dorsalis (PGD) in der

medullären Formatio reticularis enthält die „inhibitorischen Burst-Neurone/ IBNs/“, die während einer horizontalen Sakkade z.B. nach rechts die Motoneurone des kontralateralen linken Nucleus abducens hemmen, um konjugierte Augenbewegungen zu ermöglichen (Strassman et al., 1986, Scudder et al., 1988). Auch hier wurde an der Katze und am Affen gezeigt, dass die IBNs gleichermaßen auf die Motoneurone wie auch die internukleären Neurone im kontralateralen Nucleus abducens projizieren (Scudder et al., 1988; Horn et al., 1995; Yoshida et al., 1982). Der Nucleus präpositus hypoglossi(PrH) enthält eine relativ große Population an glycinergen Neurone (etwa 30% bei der Katze), von denen etwa drei Viertel eher kleine Zellen, vermutlich lokale Interneurone, sind (Yingcharoen et al., 1989). Mittelgroße glycinerge Neurone des PrH projizieren kontralateral zum Nucleus abducens. Der PrH spielt eine wichtige Rolle bei der Blickhaltung, wie Läsionsversuche zeigten, wonach massive Blickhaltestörungen in der horizontalen Ebene auftraten (Übersicht: McCrea und Horn, 2006).

4.3 Inhibition (γ -Aminobuttersäure(GABA) vs. Glycin)funktionaler Neuronengruppen im Nucleus abducens des Menschen

In der vorliegenden Arbeit wurden gleichermaßen starke GABAerge und glycinerge Eingänge auf die cholinergen Motoneurone und die nicht-cholinergen internukleären Neurone gefunden. Dieser quantitative Befund entspricht anatomischen und physiologischen Studien, dass Motoneurone und internukleäre Neurone weitgehend die gleichen Eingänge erhalten, z.B. von Burst Neuronen in der PPRF und PGD, oder vom PrH, was dann zu konjugierten horizontalen Blickbewegungen führt (Langer et al., 1986, Strassman et al., 1986, Übersicht: Horn, 2006). Bei den Motoneurone unterscheidet man erst seit Kurzem zwei räumlich getrennte Gruppen voneinander, die im Kern gelegenen Twitch Motoneurone, und die außerhalb der Augenmuskelkerne lokalisierten non-Twitch Motoneurone (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005). An Hand von Tracerversuchen mit Tollwut-Viren als retrograd transsynaptische Tracer, die in den M. rectus lateralis beim Rhesusaffen injiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass Twitch und non-Twitch Motoneurone von unterschiedlichen prämotorischen Eingängen kontrolliert werden. Eine Tracer-Injektion in den Muskelbauch, die zu einer Aufnahme über die einzelnen Endplatten der Twitch-Fasern und die multiplen Endplatten der non-Twitch Fasern führten, resultierte in der Markierung aller bekannten prämotorischen Neuronen, die für die Generierung von Augenbewegungen zuständig sind (Ugolini et al., 2006). Das umfasst die inhibitorischen Burst-Neurone im PGD, die excitatorischen Burst-Neurone (EBNs) in

der paramedianen pontinen Formatio reticularis (PPRF), die sekundären vestibulo-okulären Neurone in den medialen Vestibulariskernen (MV) und dem PrH. Eine kleine selektive Tracer-Injektion in Muskelsehnenübergang des M. rectus lateralis dagegen resultierte nur in der retrograd transsynaptischen Anfärbung von Neuronen im PrH, nicht aber in den Burst-Neurone, die der Sakkadengenerierung dienen (Übersicht: Horn, 2006). Aus diesen Befunden ergibt sich die Hypothese, dass die Twitch Motoneurone die Generierung der Augenbewegungen bewirken und die non-Twitch Motoneurone eher für die Blickstabilisierung über den PrH verantwortlich sind (Büttner-Ennever et al., 2002; Ugolini et al., 2006; Wasicky et al., 2004). Bisher gibt es nur eine vorläufige Studie am Rhesusaffen, bei der die Transmittereingänge auf Twitch und non-Twitch Motoneurone des M. rectus medialis verglichen wurden. Dabei fanden sich starke glutamaterge (erregende) Eingänge auf die Twitch Motoneurone und nur schwache auf die non-Twitch-Motoneurone. Beide Motoneuronenpopulationen erhielten aber gleich starke GABAerge Eingänge (Ying et al., 2008), was sich mit vorliegenden Daten zum Nucleus abducens deckt, wo im Durchschnitt gleich viele GABAerge und glycinerge Eingänge auf die Motoneurone registriert wurden. Allerdings wurden bei putativen non-Twitch Motoneuronen, die eher außerhalb des Kerns, medial zu den austretenden Fasern des Nervus abducens liegen, Neurone gefunden, die einerseits sehr starke GABAerge Eingänge aufwiesen, aber auch solche, die gar keinen GABAerge Input aufwiesen(s. Abb. 12 - Bild B2; B2/I; B2/II). Möglicherweise lassen sich die non-Twitch Motoneurone in noch weitere Untergruppen unterteilen, wie z.B. non-Twitch Motoneuroneder orbitalen Schicht versussolche der globalen Schicht, die dann auch unterschiedliche Inhibition erhalten. Bei der Glycin-Färbung zeigte sich auch innerhalb einer Neuronengruppe eine gewisse Inhomogenität aber bei allen Neuronentypen, d.h. einige Zellen der gleichen Gruppe waren Glycin-Rezeptor-positiv, die anderen negativ(s. Tab. 9; Diagr.3). Weiterführende Untersuchungen sind zur Klärung diese Phänomenenoch erforderlich.

4.4 Schlussfolgerung

Obwohl wie bei der Katze und beim Affen selektive glycinerge Eingänge auch beim Menschen im Nucleus abducens gefunden wurden, was eine ähnliche Organisation des horizontalen Augenbewegungssystems nahelegt, so können die vorliegenden Ergebnisse nicht das Konzept bestätigen, nach dem GABA nur bei der Steuerung von vertikalen und nicht bei der Steuerung der horizontalen Augenbewegungen beteiligt ist. Möglicherweise kontrollieren die glycinergen Eingänge vorwiegend die konjugierten Augenbewegungen, während GABA bei der Kontrolle von Vergenzbewegungen beteiligt sein könnte. Eine gegenüber dem Affe starke Entwicklung des Vergenz-Systems in Zusammenarbeit mit Akkommodation und einer verbesserten Fähigkeit Nah- und Fernziele zu fixieren könnte die unerwarteten starken GABAergen Eingänge auf Motoneurone und internukleäre Neurone im Nucleus abducens beim Menschen erklären. Weiterführende Studien sind zur Klärung dieser Frage erforderlich.

4.5 Zusammenfassung

Der Augapfel des Menschen bewegt sich durch sechs quergestreifte extraokuläre Augenmuskeln. Anhand morphologischer Eigenschaften lassen sich diese Muskeln in zwei Muskelfaserarten einteilen: die schnell kontrahierenden „einzeln-innervierten“ Muskelfasern (SIFs / Twitch) und die langsameren, ermüdungsresistenteren „multipel-innervierten“ Muskelfasern (MIFs / non-Twitch). Die Innervation dieser Muskelfasern erfolgt durch unterschiedliche Gruppen von Motoneuronen, die Twitch und non-Twitch Motoneuronen. Die Zellsomata befinden sich in drei paarig angelegten Kernen im zentralen Nervensystem (Nucleus oculomotorius, trochlearis, abducens).

Der Nucleus abducens des Menschen ist am Boden des vierten Gehirnventrikels und enthält vier Neuronenpopulationen, 1. - die cholinergen Twitch; 2. - non-Twitch Motoneuronen, 3. - nicht-cholinergen internukleären Neurone und 4. - die Paramedian-Trakt(PMT)-Gruppen-Neurone. Diese Neuronenpopulationen haben unterschiedliche Morphologie und histochemische Eigenschaften, dadurch lassen sie sich mit speziellen immunhistochemischen Färbungen unterscheiden. Die Motoneuronen enthalten Acetylcholin als Transmitter, dessen Synthese über das Enzym Cholinacetyltransferase erfolgt. Anhand der An- oder Abwesenheit von perineuronalen Netzen (PNN) können Twitch- und non-Twitch-Motoneuronen voneinander unterschieden werden. Die internukleären Neurone im Nucleus abducens sind nicht cholinerg, sondern die benutzen Glutamat und/oder Aspartat als Transmitter und sind mit PNN umgeben. Die vierte dorsomediale Gruppe am rostralen Ende des Nucleus abducens, die Paramedian-Trakt(PMT)-Gruppen-Neurone, die ähnliche histochemische Eigenschaften aufweisen, wie die internukleären Neurone, wurden im Rahmen dieses Projektes nicht analysiert.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung der inhibitorischen Transmittereinträge auf drei funktionelle Neuronengruppen (Twitch; non-Twitch Motoneuronen und internukleäre Neurone) im Nucleus abducens beim Menschen und inwieweit Unterschiede zu den Affen bestehen.

Die Untersuchung des Nucleus abducens erfolgte an Paraffinschnittserien zweier menschlicher Hirnstämme und an Gefrierschnittpräparaten eines weiteren Falles. Zuerst wurden histologische Schnitte von drei Ebenen (caudale, mittlere, rostrale Ebene) mit immunhistochemischen Methoden gegen Cholinacetyltransferase und perineuronale Netze für die Identifizierung der Zellen angefärbt. Anschließend wurden die angrenzenden Schnitte dieser Präparate entweder auf Glutamatdecarboxylase (GAD)

oder Glycinrezeptor alpha 1 immunhistochemisch angefärbt, um die inhibitorischen Transmittereingänge der identifizierten Zellendarzustellen.

In dieser Arbeit konnten ca. 85% der untersuchten Neurone als Motoneurone und 15 % als nicht-cholinerge internukleäre Neurone identifiziert werden. Die drei untersuchten Neuronenpopulationen erhielten gleichermaßen starke inhibitorische Eingänge von GABAergen und glycinergen Afferenzen. Damit konnte zum einen das an der Katze und am Affen entwickelte Konzept auch beim Menschen bestätigt werden, dass die Inhibition der horizontalen Augenbewegungen über Glycin vermittelt wird. Allerdings wurden im Unterschied zum Affen auch starke GABAerge Eingänge auf den Nucleus abducens registriert, deren Quellen bisher unbekannt sind. In der Zusammenschau mit aktuellen Befunden aus der Arbeitsgruppe zu einer starken GABAergen Innervation der Motoneurone des M. rectus medialis läßt sich die frühere Postulierung nicht bestätigen, dass GABA vornehmlich die vertikalen und Glycin die horizontalen Augenbewegungen kontrolliert. Es liegt vielmehr die Vermutung nahe, dass im Bereich der horizontalen Augenbewegungen eine starke Veränderung in der Ansteuerung der Motoneurone bei Menschen im Vergleich zum Affen erfolgt ist. Dies betrifft möglicherweise das Vergenzbewegungssystem, das als Teil der Nah-Triade (Vergenz; Akkommodation und Pupillenkonstriktion) beim Fokussieren von Objekten notwendig ist, und dessen prämotorische Verbindungen bisher noch unklar sind. Weiterführende Studien sind zur Klärung dieser Frage noch erforderlich.

5 Anhang zu Material und Methoden

5.1 Lösungen

- **Citrat-Puffer 0,01M pH 8,5-9,0 für Wasserbad (80°C) Paraffinschnitte**
(2,94g Sodium Citrate + 1000 ml Aqua dest.)
mit 0,1M NaOH auf pH-Wert 8,5-9,0 einstellen
- **Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0 für Mikrowellenbad Paraffinschnitte**
(2,1g Zitronensäuremonohydrat + 900ml Aqua dest.)
mit 2M NaOH auf pH-Wert 6,0 einstellen
(2M NaOH=8g NaOH in 200ml Aqua dest. lösen)
mit Aqua dest. bis 1000ml auffüllen
- **NaCl-Lösung (0,9%) für 1L**
9g NaCl in 1000 ml Aqua dest. lösen und im Kühlschrank aufbewahren.
- **PFA- 4% Paraformaldehyd in 0,1 M PBS pH 7,4 für 3L**

Lösung I	Lösung II
1500 ml Aqua dest. auf 60°C erhitzen	
120g Paraformaldehyd langsam zumischen	
5 Tropfen 40% NaOH	1500 ml 0,2 M PBS pH 7,4
Anschließend filtrieren	

Die zwei Lösungen müssen kurz vor dem Gebrauch zusammengemischt werden und den pH-Wert auf 7,4 einstellen und im Kühlschrank aufbewahren.

- **Phosphat-Puffer Saline (PBS) 0,1 M pH 7,4 für 5L (für Immunhistochemie)**
(72,1g Na₂HPO₄·2H₂O + 13,1g NaH₂PO₄·H₂O + 40g NaCl + 1g KCl)
Die Bestandteile in 5 L Aqua dest. lösen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen.
- **Stammlösung Tris-Puffer (TBS) 0,5M pH 7,6**
60,57g Trizma Base in 800ml Aqua dest. lösen
mit 37% HCL auf pH-Wert 7,6 einstellen
mit Aqua dest. auf 1L auffüllen
- **Stammlösung Phosphatpuffer (PB) 0,2 M pH 7,4 für 5L**

Lösung I	Lösung II
26,22g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O in 950ml Aqua dest. lösen	114,7g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O + 36g NaCl in 4050ml Aqua dest. lösen

Die zwei Lösungen müssen kurz vor dem Gebrauch zusammengemischt werden und den pH-Wert auf 7,4 einstellen und im Kühlschrank aufbewahren.

5.2 Protokolle

5.2.1 DAB-Reaktion

(Inkubationszeit: ca. 10 min)

Lösung I (DAB)	Lösung II (H2O2)
0,025% DAB= 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20 ml 0,05 M TBS pH7,6	10 µl 30% H2O2

Direkt vor dem Gebrauch muss die Lösung I mit Lösung II zusammengemischt werden, dadurch wird die Lösung I aktiviert.

mit Ammonium-Nickelsulfat Intensivierte DAB-Reaktion

Lösung I (DAB)	Lösung II (H2O2)
0,025% DAB= 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20 ml 0,05 M TBS pH7,6 + 40mg filtrierte Ammonium-Nickelsulfat	10 µl 30% H2O2

Direkt vor dem Gebrauch muss die Lösung I mit Lösung II zusammengemischt werden, dadurch wird die Lösung I aktiviert.

5.2.2 Immunhistochemie der Einfachfärbung, Beispiel anhand einer ChAT-Färbung

Polyclonal goat anti-choline Acetyltransferase = Chemicon, AB144P

Anleitung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1h oder Übernacht	Xylol
1x10min	100% Alkohol
1x10min	96% Alkohol
1x10min	90% Alkohol
2x10min	70% Alkohol
1x10min	Aqua dest.

Demaskierung von Antigenen

- *Natrium-Citrat-Puffer pH 8,85 min in der Mikrowelle
- * in Citratpuffer abkühlen lassen.....15 bei RT
- * kurz in Aqua dest. spülen
- * 3x 0,1M TBS pH 7,6.....5 min

1.Tag.

- *kurz 0,1M TBS pH 7,4.....10 min
- * *Peroxidaseblockierung*:30 min
- 1% H₂O₂ in 0,1M TBS
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * *Präinkubation*:.....1h bei RT
- 2% Normal Hase Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
- * *I.Antikörper*:.....48 Stunden bei RT

Ziege anti-ChAT 1:50

[in 2% Normal Hase Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2.Tag.

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **biotinilierter II.Antikörper**..... 1h bei RT

biot. Hase anti-Ziege 1:200

[in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **EAP**.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT

EAP = Extravidin-Peroxidase 1:1000

[in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 2 x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* 1x 0,05M TBS pH 7,6.....10min

*DAB-Ni Reaktion:.....10 min

0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6

- 0,025% DAB = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20ml 0,05M TBS pH 7,6 + 40 mg Ammonium Nickel filtrieren

dann> **20ml 0,025% DAB + 10 µl 30%H₂O₂**

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* In [1x 0,1M TBS + 2x Aqua dest] Schnitte aufziehen

* Trocknen lassen

* Aqua dest.....5 min

* In Alkoholreihe 70, 90, 96, 100%.....je 5 min

* 3x Xylol.....kurz, 5 min und 15min

* Eindeckeln

5.2.3 Immunhistochemie der Doppelfärbung, Beispiel anhand einer ChAT/GAD-Färbung

Polyclonal goat anti-choline Acetyltransferase = Chemicon, AB144P

Mouse monoclonal antibody to Glutamate Decarboxylase (GAD)= Biotrend: GC 3108

Anleitung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1h oder Übernacht	Xylol
1x10min	100% Alkohol
1x10min	96% Alkohol
1x10min	90% Alkohol
2x10min	70% Alkohol
1x10min	Aqua dest.

Demaskierung von Antigenen

*Sodium Citrate Puffer pH 8,85 min in der Mikrowelle

* in Citratpuffer abkühlen lassen.....15 bei RT

* kurz in Aqua dest. spülen

* 3x 0,1M TBS pH 7,6.....5 min

1.Tag.

*kurz 0,1M TBS pH 7,4.....10 min

* *Peroxidaseblockierung:*30 min

1% H₂O₂ in 0,1M TBS

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* *Präinkubation:*.....1h bei RT

2% Normal Hase Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

* ***I.Antikörper:***48 Stunden bei RT

Ziege anti-ChAT 1:50

[in 2% Normal Rabbit Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2.Tag.

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **biotinilierter II.Antikörper:**.....1h bei RT

biot. Hase anti-Ziege 1:200

[in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **EAP**.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT

EAP = Extravidin-Peroxidase 1:1000

[in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 2 x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* 1x 0,05M TBS pH 7,6.....10 min

*DAB-Ni Reaktion:.....10 min

0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6

- 0,025% DAB = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20ml 0,05M TBS pH 7,6 + 40 mg Ammonium Nickel filtrieren

dann> **20ml 0,025% DAB + 10 µl 30%H₂O₂**

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **Peroxidaseblockierung:**30 min

1% H₂O₂ in 0,1M TBS pH 7,4

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **Präinkubation:**.....1h bei RT

2% Normal Pferd Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

* **III.Antikörper:**

48 Stunden bei RT oder über das Wochenende bei 4°C im Kühlschrank

monoclonal mouse anti-GAD 1:4000

[in 2% Normal Pferd Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

3.Tag.

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **biotinilierter IV.Antikörper**:.....1h bei RT

biot. Pferd anti-Mouse 1:200

[in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* **EAP**.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT

EAP = Extravidin-Peroxidase 1:1000

[in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 2 x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* 1x 0,05M TBS pH 7,6.....10 min

*DAB-Reaktion:10 min

0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6

- 0,025% DAB = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20ml 0,05M TBS pH 7,6

dann> **20ml 0,025% DAB + 10 µl 30%H₂O₂**

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* In [1x 0,1M TBS + 2x Aqua dest] Schnitte aufziehen

* Trocknen lassen

* Aqua dest.....5 min

* In Alkoholreihe 70, 90, 96, 100%.....je 5 min

* 3x Xylol.....kurz, 5 min und 15 min

* Eindecken

Doppelfärbung	1.Tag	2. Tag		3. Tag
	I	IIbiotiniliertes	III	IV
	Antikörper	Antikörper	Antikörper	biotiniliertes Antikörper
ChAT + CSPG	Ziege anti-ChAT 1:50 bzw. 1:100	biot. Hase-anti- Ziege 1:200	Maus anti- CSPG 1:500	biot. Pferd-anti- Maus 1:200
ChAT + GAD	Ziege anti-ChAT 1:50 bzw. 1:100	biot. Hase-anti- Ziege 1:200	monoclonal Maus anti- GAD 1:4000	biot. Pferd-anti- Maus 1:200
ChAT + GlycR1	Ziege anti-ChAT 1:50 bzw. 1:100	biot. Hase-anti- Ziege 1:200	Maus anti- GlycR1 1:1000	biot. Pferd-anti- Maus 1:200
ChAT + GlycT2	Ziege anti-ChAT 1:50 bzw. 1:100	biot. Hase-anti- Ziege 1:200	Schaf anti- Glycine Transporter 2 1:5000	biot. Hase-anti- Schaf 1:200

Tab. 10 - Zusammenfassung der Reihenfolge der benutzten Antikörpern

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - Übersicht der extraokulären Augenmuskeln des Menschen	2
Abb. 2 - Schematische Darstellung des Auges in der Orbita	3
Abb. 3 - Schematische Darstellung der Kompartimente der extraokulären..... Augenmuskeln.....	5
Abb. 4 - Schematische Darstellung der Muskelfasertypen im Augenmuskel.....	8
Abb. 5 – Darstellung der Lokalisation des Nucleus abducens im Hirnstamm.....	10
Abb. 6 - Darstellung der vier Neuronentypen des Nucleus abducens.....	11
Abb. 7 – Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im .. Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun).....	24
Abb. 8 - Demonstration der unterschiedlichen Färbeintensitäten der Immunfärbungen im Nucleus abducens.....	28
Abb. 9 - Darstellung der Schrumpfung der Zellen und deren Beseitigung.....	30
Abb. 10 - Transversalschnitte durch den rechten Nucleus abducens in drei..... Ebenen(caudo-rostral)	32
Abb. 11 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im .. Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder..... GAD (braun)	37
Abb. 12 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im .. Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder..... GAD (braun)	41
Abb. 13 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im .. Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder..... GlycR α 1 (schwarz).....	48
Abb. 14 - Übersicht der Färbereigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen im .. Nucleus abducens nach Immunfärbung auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun) oder..... GlycR α 1 (schwarz).....	50
Abb. 15 - Schematische Darstellung der vestibulo-okulären Reflexbahnen bei..... horizontaler Kopfdrehung	60

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 - Übersicht der extraokulären Augenmuskeln und deren detaillierte Funktion	4
Tab. 2 - Übersicht der Herkunft und Besonderheiten der Präparate	15
Tab. 3 - Übersicht der verwendeten Antikörpern	19
Tab. 4 - Übersicht der Antikörpern der speziellen Immunhistochemie der	
Einfachfärbungen und deren Verdünnung	20
Tab. 5 - Übersicht der Kombinationen der Einfachfärbungen, die für die Doppelfärbung gekoppelt wurden	21
Tab. 6 - Übersicht der Färbeeigenschaften der Neuronen für die Identifizierung dieses.... Projektes	23
Tab. 7 - Zusammenfassung der Ergebnisse der ChAT/ GAD Doppelfärbung.....	44
Tab. 8 - Unterschiede der GAD-haltigen Endigungen der non-Twitch Motoneruone....	45
Tab. 9 - Zusammenfassung der Ergebnisse der GlycinR α 1 Einfachfärbung	52
Tab. 10 - Zusammenfassung der Reihenfolge der benutzten Antikörper	73

8 Diagrammverzeichnis

Diagr. 1 - Vergleich verschiedener Messmethoden	30
Diagr. 2 - Mittelwerte der Ergebnisse (ChAT / GAD).....	45
Diagr. 3 - Prozentuale Verteilung der Glycin positiven vs. Glycin negativen Neurone	52

9 Abkürzungsverzeichnis

A. dest	Aqua destillata
ChAT:	Choline Acetyltransferase
CSPG:	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
DPX:	DPX Mountant for Histology
DAB:	Diaminobenzidin
DAB-Ni:	Diaminobenzidin mit Nickelsulfate
EAP:	Extravidin-Peroxidase
EBNs:	excitatorischen Burst-Neuronen
GABA:	γ -Aminobuttersäure
GAD:	Glutamat Decarboxylase
GlycR α 1:	Glycinrezeptor Alpha 1
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
IBNs:	inhibitorischen Burst-Neuronen
IO:	Musculus obliquus inferior
IR:	Musculus rectus inferior
LR:	Musculus rectus lateralis
LPS:	Levator palpebrae superior
M:	Musculus
M:	Molar
MIF:	Multipel-innervierte Muskelfaser
MLF:	Fasciculus longitudinalis medialis
MR:	Musculus rectus medialis
MVN:	Nucleus vestibularis medialis
Ncl:	Nucleus
NIII:	Nervus oculomotorius
NVI:	Nervus abducens
NVII:	Nervus facialis
NP-NF:	nicht phosphorylierte Neurofilamente
III:	Nucleus oculomotorius
PBS:	Phosphatpuffer/ NaCl
PFA:	Paraformaldehyd
PGD:	Nucleus paragigantocellularis dorsalis
PMT-Gruppen-Neurone:	Zellgruppe des paramedian-Traktes

PPRF:	paramedian pontine Formatio reticularis
PrH:	Nucleus präpositus hypoglossi
SMI32:	Sternberger Monoclonas Incorporated (Neurofilament Antikörper)
SR:	Musculus rectus superior
SIF:	Einzelnnervierte Muskelfaser
SO:	Musculus obliquus superior
TBS:	Tris-Puffer/ NaCl
TBS-RSA:	Tris-Puffer/ NaCl- RinderserumAlbumin
VOR:	vestibulo-okulärer-Reflex

10 Literatur

Anagnostou E, Spengos K, Margeti S, Vassilopoulou S, Paraskevas GP, Zis V. 2009. Vertical and horizontal integrator failure in a ponto-medullary infarction: A possible role for paramedian tract neurons. *J Neurol Sci* 280(1-2):118-119.

Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15(8):303-308.

Bannai M, Kawai N. 2012. New therapeutic strategy for amino acid medicine: glycine improves the quality of sleep. *J Pharmacol Sci* 118(2):145-148.

Bertolotto A, Manzardo E, Guglielmone R. 1996. Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfate proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell and Tissue Research* 283:283-295.

Blümcke I, Celio MR. 1992. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18. *Exp Brain Res* 92(1):39-45.

Bondi, A. Y. and Chiarandini, D. J. 1983. Morphologic and electrophysiologic identification of multiply innervated fibers in rat extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(4):516-9.

Borden LA. 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* 29(4):335-356.

Bourne JA. 1983. *Handbuch I der Immunperoxidasefärbemethoden*. Hamburg: DAKOcorporation. p -.

Brandt DE, Leeson CR. 1966. Structural differences of fast and slow fibers in human extraocular muscle. *Am J Ophthalmol* 62(3):478-487.

Brauer K, Werner L, Leibnitz L. 1982. Perineuronal nets of glia. *Hirnforschung* 23:701-708.

Brooke MH, Kaiser KK. 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23(4):369-379.

Brückner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8(3):183-200.

Brückner G, Seeger G, Brauer K, Härtig W, Kacza J, Bigl V. 1994. Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the mongolian gerbil and rat. *Brain Research* 658:67-86.

Buresch 2005. Neuroanatomie Charakterisierung Blickstabilisierender Neurone an der Hirnstammittellinie der Primaten, einschließlich des Menschen - Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Burke RE, Levine DN, Zajac FE, 3rd. 1971. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174(10):709-712.

Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE, 3rd. 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234(3):723-748.

Büttner-Ennever JA, Akert K. 1981. Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J Comp Neurol* 197(1):17-27.

Büttner-Ennever JA, Büttner U. 1988. Neuroanatomy of the oculomotor system. The reticular formation. *Rev Oculomot Res* 2:119-176.

Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Schmidtke K. 1989. Cell groups of the medial longitudinal fasciculus and paramedian tracts. *Revue Neurologique (Paris)* 145:533-539.

Büttner-Ennever, J. A. 1992. Paramedian tract cell groups: a review of connectivity and oculomotor function. In: Shimazu H. and Shinoda Y. (Eds.), *Vestibular and Brain Stem Control of Eye, Head and Body Movement*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Karger, Basel, pp. 323-330.

Büttner U, Straube A. 1995. The effect of cerebellar midline lesions on eye movements. *Neuro-Ophthalmol* 15(2):75-82.

- Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *Journal of Comparative Neurology* 438:318-335.
- Büttner-Ennever JA, Horn AK, Graf W, Ugolini G. 2002. Modern concepts of brainstem anatomy: from extraocular motoneurons to proprioceptive pathways. *Ann N Y Acad Sci* 956:75-84.
- Büttner-Ennever JA. 2006. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Prog Brain Res* 151:95-125.
- Büttner U, Büttner-Ennever JA. 2006. Present concepts of oculomotor organization. *Prog Brain Res* 151:1-42.
- Carpenter MB, Periera AB, Guha N. 1992. Immunocytochemistry of oculomotor afferents in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Hirnforsch* 33(2):151-167.
- Celio MR, Blümcke I. 1994. Perineuronal nets - a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Research Reviews* 19:1128-1145.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. 1998. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21(12):510-515.
- Clark RA, Miller JM, Demer JL. 1997. Location and stability of rectus muscle pulleys. Muscle paths as a function of gaze. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(1):227-240.
- de la Cruz RR, Pastor AM, Martinez-Guijarro FJ, Lopez-Garcia C, Delgado-Garcia JM. 1992. Role of GABA in the extraocular motor nuclei of the cat: a postembedding immunocytochemical study. *Neuroscience* 51(4):911-929.
- Demer JL, Miller JM, Poukens V, Vinters HV, Glasgow BJ. 1995. Evidence for fibromuscular pulleys of the recti extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(6):1125-1136.
- Demer JL, Oh SY, Poukens V. 2000. Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6):1280-1290.
- Demer JL. 2002. The orbital pulley system: A revolution in concepts of orbital anatomy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 956:17-32.

- DeYoe EA, Hockfield S, Garren H, Van Essen DC. 1990. Antibody labelling of functional subdivisions in visual cortex: Cat-301 immunoreactivity in striate and extrastriate cortex of the macaque monkey. *Visual Neuroscience* 5:67-81.
- Dietert SE. 1965. The demonstration of different types of muscle fibers in human extraocular muscle fibers in human extraocular muscle by electron microscopy and cholinesterase staining. *Invest Ophthalmol* 4:51-63.
- Eberhorn AC, Ardelenanu P, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2005. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *Journal of Comparative Neurology* 491:352-366.
- Eberhorn AC, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2006. Identification of motoneurons supplying multiply- or singly-innervated extraocular muscle fibers in the rat. *Neuroscience* 137:891-903.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7(1):91-100.
- Fuchs AF, Luschei ES. 1971. Development of isometric tension in simian extraocular muscle. *J Physiol* 219:155-166.
- Fuchs AF, Scudder CA, Kaneko CR. 1988. Discharge patterns and recruitment order of identified motoneurons and internuclear neurons in the monkey abducens nucleus. *J Neurophysiol* 60(6):1874-1895.
- Gamlin PD, Gnadt JW, Mays LE. 1989. Lidocaine-induced unilateral internuclear ophthalmoplegia: effects on convergence and conjugate eye movements. *J Neurophysiol* 62(1):82-95.
- Han Y, Wang J, Fischman DA, Biller HF, Sanders I. 1999. Slow tonic muscle fibers in the thyroarytenoid muscles of human vocal folds; a possible specialization for speech. *The anatomical record* 256:146-157.
- Hansen KB, Ogden KK, Traynelis SF. 2012. Subunit-Selective Allosteric Inhibition of Glycine Binding to NMDA Receptors. *J Neurosci* 32(18):6197-6208.
- Härtig W, Brauer K, Bigl V, Brückner G. 1994. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Research* 635:307-311.

Horn, A.K.E., Büttner-Ennever, J.A., Suzuki, Y., and Henn, V. 1995. Histological identification of premotor neurons for horizontal saccades in monkey and man by parvalbumin immunostaining. *J. Comp. Neurol*, 359, 350-363.

Horn AK, Bruckner G, Hartig W, Messoudi A. 2003. Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol* 455(3):341-352.

Horn, A. K. 2006. The reticular formation. *Prog Brain Res* 151: 127-155.

Horn AK, Eberhorn A, Hartig W, Ardeleanu P, Messoudi A, Büttner-Ennever JA. 2008. Periocolomotor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 507(3):1317-1335.

Horn AKE, Che Ngwa E, Büttner-Ennever JA 2009. Histochemistry and location of motoneuron subgroups in the oculomotor nucleus of human. *Soc. Neurosci. Abstr.* 35:356.10

Horn AK, Adamczyk 2012. Reticular formation: eye movements, gaze and blinks. In Mai, Paxinos (eds): *The Human Nervous System*, 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, pp. 328-366.

Horng, A. 2011. Neuroanatomische Identifizierung funktioneller Neurone im Nucleus abducens des Menschen, (Doktorarbeit: Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München.)

Huppelsberg J. 2005. – Physiologie, Thieme, 2. Auflage ISBN:3-13-136432-7 (Kap.12.3.4 / Seite 248-249)

Ichikawa T, Shimizu T. 1998. Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Research* 779:96-103.

Kaczmarek F. 1974. Motor end-plates in the extraocular muscles of small mammals. *Acta Anat (Basel)* 89(3):372-386.

Kanski J. J. 2008 a; b. - *Klinische Ophthalmologie*, Urban&Fischer, 6. Auflage ISBN: 978-3-437-23472-9. (a - Kap. 20.1.2 / Seite 754-757; b – Kap. 21.8-21.10 / Seite 837-846)

Karrow T. 2009 a; b. - Pharmakologie und Toxikologie, 17. Auflage,(a – Kap.1.1 / Seite2-10; b - Kap. 2.1.4.1 / Seite 84-87)

Kaufmann H. 2004 – Strabismus, Thieme, 3. Auflage ISBN: 3-13-129723-9 (Kap. 1.2.4 / Seite 37-44)

Kaufman P.L. 2003 a; b; c; d. - Adler's Physiology of the Eye, Mosby, 10. Auflage ISBN.: 978-0-323-01136-05. (a – Kap. 14 / Seite 808-809; b – Kap. 14 / 798-803; c – Kap. 10/ Seite 333-336; d – Kap. 8 / 397-398)

Kawai K, Serizawa A, Hamana T, Tsutsumi Y. 1994. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol Int* 44(10-11):759-764.

Kono R, Poukens V, Demer JL. 2002. Quantitative analysis of the structure of the human extraocular muscle Pulley system. *InvestOphthalVisSci* 43(9):2923-2932.

Königshoff M. 2004 a. - Biochemie, Thieme, Auflage ISBN:3-13-136411-4 (Kap. 10.4 / Seite 274-279)

Krüger, P. 1949. Die Innervation der tetanischen und tonischen Fasern der quergestreiften Skelettmuskulatur der Wirbeltiere. *Anat Anz*(97):169

Kuhse J, Laube B, Magalei D, Betz H. 1993. Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11(6):1049-1056.

Langer TP, Fuchs AF, Scudder CA, Chubb MC. 1985. Afferents to the flocculus of the cerebellum in the rhesus macaque as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* 235:1-25.

Langer, T., C. R. Kaneko, et al. 1986. Afferents to the abducens nucleus in the monkey and cat. *J Comp Neurol* 245(3): 379-400.

Leigh RJ, Zee DS. 2006. The Neurology of Eye Movements. Leigh RJ, Zee DS, editors. New York: Oxford University Press. 3-762 p.

Lennerstrand, G. and Nichols, K. C. 1977. Morphology of motor units in cat extraocular nodule. *Acta Ophtalmol (Copenh)* 55(6):913-8.

Mays, L. E. and J. D. Porter 1984. Neural control of vergence eye movements: activity of abducens and oculomotor neurons. *J Neurophysiol* 52(4): 743-761.

McCrea R, Horn AKE 2006. Prepositus nucleus. *Prog. Brain Res.* 151:205-230

McQuaid S, McConnell R, McMahon J, Herron B. 1995. Microwave antigen retrieval for immunocytochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded post-mortem CNS tissue. *J Pathol* 176(2):207-216.

Miller JM, Demer JL, Poukens V, Pavlovski DS, Nguyen HN, Rossi EA. 2003. Extraocular connective tissue architecture. *J Vis* 3(3):240-251.

Morgan DL, Proske U. 1984. Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol Rev* 64:103-138.

Munakata S, Hendricks JB. 1993. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 41(8):1241-1246.

Nakamagoe K, Iwamoto Y, Yoshida K. 2000. Evidence for brainstem structures participating in oculomotor integration. *Science* 288(5467):857-859.

Nakao S, Sasaki S. 1980. Excitatory input from interneurons in the abducens nucleus to medial rectus motoneurons mediating conjugate horizontal nystagmus in the cat. *Experimental Brain Research* 39:23-32.

Namba T, Nakamura T, Grob D. 1968. Motor nerve endings in human extraocular muscle. *Neurology* 18(4):403-407.

Nguyen, L. T. and Spencer, R.F. 1999. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.*, 411: 73-78.

Oda Y. 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49(11):921-937.

Oh SY, Poukens V, Demer JL. 2001. Quantitative analysis of rectus extraocular muscle layers in monkey and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1):10-16.

Osterwalder E. - Immunhistochemie kompakt (Seite 9-10)

(http://www.histologietechnik.ch/downloads/einfuehrung_immunhistochemie.pdf)

Pabel J, Faust M, Prehn C, Worlein B, Allmendinger L, Hofner G, Wanner KT. 2012. Development of an (S)-1-{2-[Tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl}piperidine-3-carboxylic acid [(S)-SNAP-5114] Carba Analogue Inhibitor for Murine gamma-Aminobutyric Acid Transporter Type 4. ChemMedChem.

Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. 1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry 11(14):2627-2633.

Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. 1995. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. Surv Ophthalmol 39(6):451-484.

Porter JD, Poukens V, Baker RS, Demer JL. 1996. Structure-function correlations in the human medial rectus extraocular muscle pulleys. Investigative Ophthalmology & Visual Science 37:468-472.

Ranvier L. 1874. De queleues faits reltifs a l'histologie et a la physiologie des muscels stries. Arch. Physiol. Norm. Pathol., 1:5.

Robinson DA. 1970. Oculomotor unit behavior in the monkey. J Neurophysiol 38:393-404.

Röhlich Pál 2002. – Szövettan = Histologie, Semmelweiss Universität, 2. Auflage ISBN 963-9129-37-2 (Kap. 9 / Seite 166)

Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T. 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. J Muscle Res Cell Motil 10(3):197-205.

Schiaffino S, Reggiani C. 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. J Appl Physiol 77(2):493-501.

Scudder, C. A., Fuchs, A. F., and Langer, T.P. 1988. Charateristics and functional identification of saccadic inhibitory burst neurons in the alert monkey. J. Neurophysiol. 59, 1430-1454.

Seeger G, Brauer K, Härtig W, Brückner G. 1994. Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide hsitochemistry and lectin. Neuroscience 58:2371-2388.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39(6):741-748.

Spencer RF, Baker R. 1986. Histochemical localization of acetylcholinesterase in relation to motor neurons and internuclear neurons of the cat abducens nucleus. *J Neurocytol* 15(2):137-154.

Spencer RF, Wenthold RJ, Baker R. 1989. Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus. *J Neurosci* 9(8):2718-2736.

Spencer RF, Baker R. 1992. GABA and glycine as inhibitory neurotransmitters in the vestibuloocular reflex. *Ann N Y Acad Sci* 656:602-611.

Spencer RF, Wang SF, Baker R. 1992. The pathways and functions of GABA in the oculomotor system. *Prog Brain Res* 90:307-331.

Spencer RF, Porter JD. 2006. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res* 151:43-80.

Steiger HJ, Büttner-Ennever J. 1978. Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: a double retrograde tracer study in the cat. *Brain Res* 148(1):181-188.

Sternberger LA, Sternberger NH. 1983. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(19):6126-6130.

Strassman, A., Highstein, S.M. and McCrea, R.A. 1986. Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. II. Inhibitory burst neurons. *J. Comp. Neurol.*, 249: 358-380.

Szabo T, Lazar G, Libouban S, Toth P, Ravaille M. 1987. Oculomotor system of the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Journal of Comparative Neurology* 264:480-493.

Szentágothai J. 1971. - Funktionelle Anatomie, 3. Band (Kap. 8.5.2.4)

Tahan SR, Wei Y, Ling P, Bistrrian BR. 1995. Influence of formalin fixation time and tissue processing method on immunoreactivity of monoclonal antibody PC10 for proliferating cell nuclear antigen. *Mod Pathol* 8(2):177-182.

Tittel K. 2003. - Beschreibende und Funktionelle Anatomie des Menschen, Urban&Fische; 14. Auflage ISBN: 3-437-46151-6 (Kap.7.3 / Seite 55-58)

Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C. 2000/4/7. Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *BrainRes* 861:45-58.

Ugolini G, Klam F, Doldan Dans M, Dubayle D, Brandi AM, Büttner-Ennever J, Graf W. 2006. Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: differences in monosynaptic input to "slow" and "fast" abducens motoneurons. *J Comp Neurol* 498(6):762-785.

Vijayashankar N, Brody H. 1977. A study of aging in the human abducens nucleus. *J Comp Neurol* 173(3):433-438.

Wasicky R, Zhya-Ghazvini F, Blumer R, Lukas JR, Mayr R. 2000. Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. *InvestOphthalVisSci* 41:980-990.

Wasicky R, Horn AK, Buttner-Ennever JA. 2004. Twitch and nontwitch motoneuron subgroups in the oculomotor nucleus of monkeys receive different afferent projections. *J Comp Neurol* 479(2):117-129.

Wentzel PR, Gerrits NM, de Zeeuw CI. 1996. GABAergic and glycinergic inputs to the rabbit oculomotor nucleus with special emphasis on the medial rectus subdivision. *Brain Res* 707(2):314-319.

Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24(7):1016-1019.

Ying, H. S., K. Fackelmann, et al. 2008. Neuronal signalling expression profiles of motoneurons supplying multiply or singly innervated extraocular muscle fibres in monkey. *Prog Brain Res* 171: 13-16.

Yingcharoen, K., E. Rinvik, et al. 1989. GABA, glycine, glutamate, aspartate and taurine in the perihypoglossal nuclei: an immunocytochemical investigation in the cat with particular reference to the issue of amino acid colocalization. *Exp Brain Res*78(2): 345-357.

Yoshida, K., R. McCrea, et al. 1982. Morphological and physiological characteristics of inhibitory burst neurons controlling horizontal rapid eye movements in the alert cat. *J Neurophysiol*48(3): 761-784.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erste Stelle möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die geduldige und ständige Unterstützung und Beratung beim Erstellen der Arbeit sehr herzlich bei **Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler** und der ganzen **Oculomotorius Gruppe** bzw. bei **Prof. Dr. med. Jens Waschke** und der **Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München** bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei **meiner Familie v.a. meiner Frau** bedanken, dass sie mich jeder Zeit unterstützt hat, damit ich mich voll auf meine Doktorarbeit konzentrieren konnte.

Ein besonderer Dank gilt der **Chiemsee Augen Tagesklinik** v.a. **Frau Prof. I. Lanzl**, die immer wieder die Zeit für die Doktorarbeit freigegeben hat.

Desweiteren ein besonderer Dank an die **Gerichtsmedizin und Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München** für die Bereitstellung der menschlichen Gehirnpräparate.

Leider können hier nicht alle Leute benannt werden, die diese Doktorarbeit vorantrieben, aber hiermit möchte ich die Möglichkeit nutzen und mich nochmal **bei allen** bedanken, die zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

12 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Dombi, Ádám (geb.: 06.08.1981)

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„ Inhibitorische Transmittereingänge auf funktionelle Neuronengruppen

im Nucleus abducens des Menschen“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrift um ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Eidesstattliche Versicherung

Stand: 31.01.2013